

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación



FACULTAD DE
CIENCIAS



TECNOLOGÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y
SÍNTESIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN
DE ÉSTERES DE FITOESTEROLES Y OTROS
INGREDIENTES LIPÍDICOS FUNCIONALES

GUZMÁN TORRELO VILLA

Tesis doctoral

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

**TECNOLOGÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y
SÍNTESIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN
DE ÉSTERES DE FITOESTEROLES Y OTROS
INGREDIENTES LIPÍDICOS FUNCIONALES**

Memoria presentada por:

Guzmán Torrelo Villa

Para optar al grado de:

**DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Carlos F. Torres Olivares
(Universidad Autónoma de Madrid)

Dr. Fco. Javier Señoráns Rodríguez
(Universidad Autónoma de Madrid)

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Guillermo Reglero Rada el haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera científica y formarme profesionalmente en el Grupo de Investigación de Tecnología de los Alimentos de la UAM. Gracias por su confianza, sus consejos y por su admirable dedicación al grupo.

Quiero dar las gracias, de manera muy especial, al Dr. Carlos Torres Olivares por todo lo que me ha enseñado durante este tiempo, por su paciencia, por su disponibilidad para responder a las preguntas y debatir ideas, por su trato, su confianza, su buen humor y su amistad.

Al Dr. F. Javier Señoráns Rodríguez quiero agradecerle que despertase en mí el interés por la investigación, su apuesta por mí desde el principio y su paciencia a la hora de hacer frente a la burocracia, entre otras muchas cosas.

Al resto de doctores y profesores del Área de Tecnología de los Alimentos de la UAM por su trato cercano y amable, y por todo lo que he aprendido de ellos.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la UAM durante este tiempo: Dani, Luis, Jose Mendiola, Victor, Oscar, Alberto, Gonzalo, Bea y Erica; a los que se fueron: Sergio y Luz; y a todas las nuevas incorporaciones, por los momentos vividos fuera y dentro del laboratorio, por su amistad, por las risas y por el buen ambiente que ayudan a crear.

Gracias a mi familia, y de manera muy especial a mis padres, por estar en cada momento de mi vida, por su cariño, por escucharme y darme su opinión en todo momento, por confiar en mí y por tener gran culpa de ser quien soy.

A Estibaliz, por quererme tanto, por todo este tiempo juntos, por descubrirme los momentos tetería. Have I told you lately how much I love you?

A todos mis amigos, tanto de Andalucía como de Madrid, agradecer su amistad, cariño y buenos momentos. No pongo los nombres para no olvidarme de ninguno.

Esta Tesis ha sido posible gracias al Contrato de Personal Investigador concedido por la Comunidad de Madrid y a la financiación del Proyecto AGL-2008-05655 del MICINN

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	5
PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS.....	7
INTRODUCCIÓN	9
1. ALIMENTOS FUNCIONALES O SALUDABLES	9
1.1. CONCEPTO DE ALIMENTOS FUNCIONALES	10
1.2. DISEÑO DE NUEVOS ALIMENTOS FUNCIONALES.....	11
1.3. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y LA EFICACIA DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES	11
1.4. ALEGACIONES DE SALUD O DE PROPIEDADES SALUDABLES.....	12
2. INGREDIENTES LIPÍDICOS CON PROPIEDADES FUNCIONALES.....	14
2.1. ESTEROLES VEGETALES O FITOESTEROLES.....	15
2.1.1. Definición y tipos de esteroides vegetales.....	15
2.1.2. Fuentes de esteroides vegetales e ingesta	18
2.1.3. Papel fisiológico del colesterol.....	21
2.1.4. Efectos potenciales de los esteroides vegetales sobre el metabolismo del colesterol: mecanismos de acción	26
2.1.5. Formulación o modos de administración de esteroides vegetales	34
2.1.6. Alimentos enriquecidos con esteroides vegetales	35
2.1.7. Otros efectos biológicos de los esteroides vegetales	36
2.1.8. Seguridad y eficacia de los esteroides vegetales	38
2.2. TOCOFEROLES	40
2.2.1. Definición, tipos y fuentes.....	40
2.2.2. Propiedades beneficiosas y efectos sobre la salud.....	42
2.3. ÁCIDOS GRASOS BIOACTIVOS O FUNCIONALES.....	43
2.3.1. Ácidos grasos omega 3, omega 6	46
2.3.2. Ácidos grasos omega 9.....	49
2.3.3. Ácidos grasos trans.....	50
2.3.4. Ácido linoleico conjugado (CLA).....	52
Actividades biológicas del CLA.....	54

Interacción entre isómeros del CLA	55
Aspectos de seguridad	56
Estudios en seres humanos	57
Preocupaciones de seguridad en los seres humanos. Estudios de toxicidad	60
2.3.5. Ácido vaccénico	61
2.3.6. Ácidos grasos de cadena media	63
2.3.7. Ácidos grasos de cadena corta	72
Ácido butírico	74
3. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	76
3.1. PROPIEDADES FÍSICO- QUÍMICAS DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	76
3.2. ELECCIÓN DEL SOLVENTE	80
3.3. MODIFICADORES	84
3.4. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE).....	86
3.4.1. Instrumentación	86
3.4.2. Tipos de extracción.....	89
3.4.3. Variables SFE.....	91
3.4.4. Ventajas y desventajas de la extracción supercríticas	92
3.4.5. Aplicaciones a escala industrial.....	94
3.5. OTRAS APLICACIONES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	95
4. INTRODUCCION A LA BIOCATALISIS	97
4.1. ENZIMAS.....	98
4.1.1. Estructura y mecanismo	100
4.1.2. Especificidad	100
4.1.3. Ventajas y desventajas de la biocatálisis	101
4.1.4. Aplicaciones industriales de las enzimas.....	107
4.1.5. Lipasas.....	110
Especificidad de las lipasas	113
Factores que afectan a la actividad y la selectividad de las lipasas	116
El medio de reacción	117
Aplicaciones de las lipasas	118
Lipasas y SFE	120
5. BIBLIOGRAFÍA.....	121

CAPITULO II: PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO EN DOS ETAPAS PARA LA OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE ESTEROL, TOCOFEROLES Y LOS ÉSTERES ETÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE DESTILADOS DE DESODORIZACIÓN DE ACEITE DE SOJA..... 153

1.	INTRODUCCIÓN	157
1.1.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	158
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	160
2.1.	MUESTRAS Y REACTIVOS	160
2.2.	ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROLES DEL DDSMO	161
2.3.	REACCIÓN DE ETIL ESTERIFICACIÓN.....	161
2.4.	PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA	161
2.5.	METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN	164
2.6.	ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS LIPÍDICAS DE PARTIDA, PRODUCTOS DE REACCIÓN, EXTRACTOS Y FRACCIONES NO EXTRAÍDAS.	166
2.6.1.	Preparación de las muestras.....	166
2.6.2.	Análisis de AGEES por cromatografía de gases	167
2.6.3.	Análisis de lípidos neutros por HPLC-ELSD.....	168
2.7.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA	170
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	171
3.1.	ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROLES DEL DDSMO	171
3.2.	ETIL ESTERIFICACIÓN DE LOS AGL DEL DDSMO	176
3.3.	EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DEL PRODUCTO FINAL.....	179
4.	CONCLUSIONES	184
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	186

CAPÍTULO III: ESTERIFICACIÓN GRADUAL DE FITOESTEROLES CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO, CATALIZADA POR LA LIPASA DE *CANDIDA RUGOSA* EN MEDIO LIBRE DE DISOLVENTES.....187

1.	INTRODUCCIÓN	191
1.1.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	191
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	192
2.1.	MUESTRAS Y REACTIVOS	192
2.2.	ESTERIFICACIÓN DE LOS ESTEROLES DEL DDG.....	193

2.3.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA	193
2.4.	ANÁLISIS POR HPLC.....	193
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	193
3.1.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA	193
3.2.	EFFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA	194
3.3.	RELACIÓN MOLAR.....	196
4.	CONCLUSIONES	200
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	201

CAPÍTULO IV: ESTERIFICACIÓN GRADUAL DE FITOESTEROLES CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO, CATALIZADA POR LA LIPASA DE *CANDIDA RUGOSA* EN MEDIO LIBRE DE DISOLVENTES.....203

1.	INTRODUCCIÓN	207
1.1.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	208
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	209
2.1.	MUESTRAS Y REACTIVOS.....	209
2.2.	REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN POR ETANOLISIS EN MEDIO BÁSICO DE LA GRASA LÁCTEA	210
2.3.	PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN SUPERCÁRITICA	211
2.4.	METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN	211
2.5.	ANÁLISIS DE AGEÉ DE GRASA LÁCTEA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ON-COLUMN.....	212
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	212
3.1.	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y RENDIMIENTOS	212
3.2.	COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN EL FRACCIONAMIENTO SUPERCÁRITICO	216
4.	CONCLUSIONES	223
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	224

CAPÍTULO V: ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON ÁCIDO BUTÍRICO Y DISTINTOS ÁCIDOS GRASOS DE GRASA LÁCTEA.	225
1. INTRODUCCIÓN	229
1.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	229
2. MATERIALES Y MÉTODOS	231
2.1. MUESTRAS Y REACTIVOS	231
2.2. REACCIÓN DE SAPONIFICACIÓN DE LA GRASA LÁCTEA	233
2.3. REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROLES	234
2.3.1. Con los ácidos grasos de la grasa láctea	234
2.3.2. Con concentrados de AGEE de cadena corta y media	234
2.3.3. Con tributirina	234
2.3.4. Con butirato de etilo	235
2.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS LIPASAS	235
2.5. CALCULO DEL PUNTO DE FUSIÓN DE LOS ÉSTERES DE FITOESTEROL CON AGL DE GRASA LÁCTEA	235
2.6. INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA DE CANDIDA RUGOSA	235
2.7. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON AGL DE GRASA LÁCTEA POR HPLC	237
2.8. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON AGL DE GRASA LÁCTEA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	237
2.8.1. Derivatización en medio ácido	238
2.8.2. Derivatización en medio básico	238
2.9. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON AGEE DE CADENA CORTA, MEDIA Y BUTIRATO DE ETILO, POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ON-COLUMN ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS	238
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	239
3.1. ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON AGL DE GRASA LÁCTEA	239
3.1.1. Lipasa inmovilizada	239
3.1.2. Evolución temporal de la reacción de esterificación	241
3.1.3. Estabilidad de las lipasas	245
3.2. ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON ÉSTERES ETÍLICOS DE AGCC Y AGCM DE GRASA LÁCTEA	245
3.2.1. Esterificación de fitoesterole con tributirina	246
3.3. ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CON BUTIRATO DE ETILO	252
4. CONCLUSIONES	254

5. BIBLIOGRAFÍA	256
CAPITULO VI: CONCLUSIONES FINALES	257
1.CONCLUSIONES FINALES	259
2.FINAL CONCLUSIONS	261
ANEXOS	263
1. INDICE DE TABLAS	265
2. INDICE DE FIGURAS	267
3. PUBLICACIONES Y PATENTES A LAS QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS	271

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados más relevantes obtenidos en el estudio de diferentes procesos para enriquecer, purificar y sintetizar ingredientes lipídicos con propiedades saludables, que tienen un alto valor añadido y pueden emplearse en la elaboración de alimentos funcionales y nutracéuticos. Las dos principales metodologías utilizadas en la presente Tesis son la extracción y fraccionamiento con fluidos supercríticos y la síntesis enzimática, que ofrecen ventajas debido a su alta versatilidad, selectividad, eficacia y respeto por el medio ambiente frente a métodos convencionales, siendo idóneas para la obtención de productos con grado alimentario.

La obtención y purificación de compuestos lipídicos minoritarios como fitoesteroles y tocoferoles ha sido abordada partiendo de destilados de desodorización de aceite de soja, empleando procesos de extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE) combinados con transformaciones químicas y enzimáticas de los materiales de partida, dando lugar a extractos y fracciones no extraídas de alto valor añadido.

Por otro lado, a partir de grasa láctea se fraccionaron otros lípidos con destacada actividad biológica, como ácidos grasos de cadena corta y cadena media (entre 4 y 12 átomos de carbono). Estos ácidos grasos, junto a otros como los diferentes isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA), se emplearon como material de partida en reacciones sin disolventes catalizadas por lipasas, permitiendo la obtención de ésteres de fitoesteroles de elevada pureza y alto potencial.

Finalmente conviene destacar que parte de los resultados descritos en la presente Tesis han sido obtenidos a escala de planta piloto, lo que les confiere una mayor viabilidad y aplicabilidad en el sector industrial. De este modo, se demuestra el empleo eficaz de diversas herramientas tecnológicamente avanzadas y limpias para el aislamiento, purificación y síntesis de diversos compuestos lipídicos con contrastada actividad biológica y elevado potencial para la producción de ingredientes alimentarios funcionales y nutracéuticos.

Summary

The present work describes the most important results obtained throughout the study of different processes for the enrichment, purification and synthesis of high added value lipidic ingredients with healthy properties that may be used in nutraceuticals and functional food production. Supercritical fluid extraction and fractionation techniques along with enzymatic synthesis have been the main methodologies employed within this thesis. These techniques are adequate for the production of food-grade ingredients and offer advantages regarding conventional methods, mainly due to the greener chemistry involved, enhanced versatility, selectivity, and efficiency.

Minor lipid component production and concentration like phytosterols and tocopherols has been scrutinized from soybean deodorizer distillate by means of countercurrent supercritical fluid extraction processes (CC-SFE) combined with chemical and enzymatic transformations of the starting materials, rendering high added value extracts and rafinates.

In addition, other lipids with important biological activity from milk fat, such as short-chain and medium chain fatty acids (4 to 12 carbon atoms) were fractionated. These fatty acids, along with others like the different isomers of conjugated linoleic acid (CLA) were used as a starting material for solvent-free reactions catalyzed by lipases allowing the collection of phytosterol esters of high purity and high potential.

Finally, it should be noted that some of the results described in this Thesis have been obtained at pilot plant scale, which confers greater viability and applicability in the industrial sector. Thus, this Thesis presents an effective use of different advanced and clean technologies for the synthesis, isolation and purification of several lipidic compounds with relevant biological activity and high potential, from which functional food ingredient preparations and nutraceuticals production might result.

Lista de abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ACAT	Acil-coenzima A colesterol acil-transferasa
AG	Ácido graso
AGCC	Ácido graso de longitud de cadena corta
AGCL	Ácido graso de longitud de cadena larga
AGCM	Ácido graso de longitud de cadena media
AGEE	Éster etílico de ácido graso
AGL	Ácido graso libre
AGME	Éster metílico de ácido graso
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGS	Ácidos grasos saturados
AGT	Ácidos grasos <i>trans</i>
ALA	Ácido alfa-linolénico
AV	Ácido vaccénico
a_w	Actividad de agua
<i>C. rugosa</i>	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
CC-SFE	Extracción con fluidos supercríticos en contracorriente
CLA	Ácido linoleico conjugado
DAG	Diacilglicerol
DDG	Destilado desodorizado de aceite de girasol
DDS	Destilado desodorizado de aceite de soja
DDS-ME	Destilado de desodorización de aceite de soja modificado enzimáticamente
DDSMO	Destilado de desodorización de aceite de soja modificado con ácido oleico
DHA	Ácido docosahexaenoico
ECV	Enfermedad cardiovascular
EF	Éster de fitoesterol
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FSC	Fluido supercrítico
FT	Fitoesteroles o esteroides vegetales

GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografía de gases con detector de masas
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High-Density Lipoprotein</i>)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i>)
IFN-g	Interferón <i>gamma</i>
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleuquina
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LDLr	Receptor de LDL
MAG	Monoacilglicerol
Pc	Presión crítica
p/p	peso/peso
Prep-SFC	Cromatografía con fluidos supercríticos a escala preparativa
SDS	Dodecilsulfato sódico
S/F	Relación disolvente/alimentación (<i>Solvent to Feed</i>)
SFC	Cromatografía con fluidos supercríticos
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SFE-CC	Extracción con fluidos supercríticos en contracorriente
SFF	Fraccionamiento con fluidos supercríticos
SRA	Receptor <i>scavenger</i> o receptor de las LDL acetiladas
TG ó TAG	Triglicérido
Tc	Temperatura crítica
TGCM	Triglicérido de cadena media
TGCL	Triglicérido de cadena larga
TNF-α	Factor <i>alfa</i> de necrosis tumoral
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>Very Low-Density Lipoprotein</i>)

Capítulo I: Introducción

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

Los expertos en nutrición recomiendan seguir una dieta sana, variada y equilibrada como la mejor manera de prevenir ciertas enfermedades asegurando una buena salud. Sin embargo, los nuevos estilos de vida han provocado que se abandonen determinados hábitos de alimentación saludables que durante años han formado parte de nuestra historia y tradición. En la sociedad actual, los desequilibrios y desajustes alimentarios están relacionados con la aparición de un gran número de enfermedades. La falta de tiempo para cocinar, el ritmo de vida actual y la enorme oferta de alimentos que hace difícil la toma de decisiones adecuadas, conduce a que muchas personas no sigan una alimentación equilibrada, y por tanto, no ingieran todos los nutrientes que necesitan o las cantidades adecuadas.

Como consecuencia de esta situación, surgen los alimentos ‘funcionales’ que pueden compensar los desequilibrios alimentarios y garantizan las ingestas de nutrientes recomendadas por los especialistas en nutrición, además de ser capaces de aportar beneficios adicionales a nuestra salud. Por este motivo, parte de la I+D+i en Ciencia y Tecnología de los Alimentos se dirige a la obtención de ingredientes alimentarios funcionales. Concretamente esta es una de las líneas de investigación fundamentales del grupo de investigación de Ciencias de la Alimentación de la UAM donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, una de las particularidades de este grupo es la forma de abordar la obtención de ingredientes alimentarios funcionales, a través del empleo de tecnologías medioambientalmente limpias, como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la biocatálisis enzimática. Es en esta línea de investigación donde se enmarca el proyecto bajo el que se inició la presente Tesis Doctoral: “Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la obtención de ingredientes alimentarios funcionales. Reacciones enzimáticas.” Los principales objetivos del mismo consistían en contribuir al desarrollo de tecnologías limpias de extracción para la producción de esteroides vegetales y la síntesis enzimática sin disolventes de distintos ésteres de esteroles con propiedades funcionales a partir de aceites, grasas y subproductos del refinado de dichos aceites.

El presente trabajo se centra en el empleo de procesos de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas y la síntesis enzimática sin el empleo de disolventes. La

memoria está dividida en cinco capítulos. El primer capítulo es una introducción general sobre el concepto de alimentos funcionales, distintos tipos de lípidos con propiedades beneficiosas, los fundamentos de la tecnología de fluidos supercríticos y las características de la biocatálisis.

En el segundo capítulo se describe la modificación enzimática de un destilado de desodorización de aceite de soja con el objetivo de facilitar el fraccionamiento de sus compuestos de interés (esteroles vegetales, tocoferoles y ácidos grasos) mediante extracción con CO₂ supercrítico.

En el tercer capítulo se aborda la esterificación enzimática de esteroles vegetales con ácido linoleico conjugado (CLA) en un medio libre de disolventes. Lo que se espera es obtener un éster de esterol más soluble que los fitoesteroles, pudiendo suministrarse a bajas dosis mientras mantiene su alta bioeficiencia y que combine el efecto beneficioso de los fitoesteroles de reducir el colesterol sanguíneo con los efectos del CLA en una sola molécula.

En el cuarto capítulo se aborda el estudio del fraccionamiento con CO₂ supercrítico de los ácidos grasos de la grasa láctea, con el objetivo de obtener extractos ricos en ácidos grasos de cadena corta y media que podrán ser utilizados como material de partida para la producción de lípidos funcionales de alto valor.

El quinto capítulo está dedicado al estudio de la esterificación enzimática sin disolventes de esteroles vegetales con los distintos ácidos grasos de la grasa láctea y con el ácido butírico. El objetivo es obtener un producto que combine los efectos beneficiosos de los fitoesteroles con alguno de los efectos de los ácidos grasos de la grasa láctea en una sola molécula. Además, al incorporar ácidos grasos de cadena corta, los ésteres de fitoesterol producidos son menos apolares y podrían presentar una mayor hidrodispersabilidad.

Por último en el sexto capítulo se exponen las conclusiones finales de los diferentes estudios presentados a lo largo de esta memoria. Asimismo, en el anexo se presentan las principales publicaciones a las que esta Tesis ha dado lugar.

INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTOS FUNCIONALES O SALUDABLES

Durante los últimos años, frente a los problemas y retos emergentes, el énfasis en Europa en temas de alimentación se ha puesto casi exclusivamente en garantizar la seguridad alimentaria, un aspecto esencial que continuará siendo el eje de todos los análisis, pero al que se añade una creciente consideración de los posibles beneficios asociados a los alimentos y sus componentes en relación con la salud, tanto para la población general como para determinados subgrupos.

Entre los principales retos del momento se encuentra el de abordar las implicaciones de los nuevos conocimientos científicos y desarrollos tecnológicos en alimentación, así como las medidas normativas que afectarán a los denominados alimentos funcionales [1, 2] y que pueden incidir en la salud y el bienestar de los consumidores. Este concepto de alimento funcional engloba la idea de ciertos alimentos que pueden tener una acción beneficiosa sobre diferentes funciones del organismo, para mejorar la salud y el bienestar de los consumidores, o reducir el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades [3]. En consecuencia, a la hora de evaluar estos alimentos, la seguridad no es lo único a considerar sino que se ha de tener en cuenta otro aspecto clave: la eficacia, es decir, si el compuesto es capaz de lograr el efecto beneficioso sobre la salud que se desea o se espera.

Mientras que los aspectos relacionados con la seguridad de los alimentos (funcionales o no) están razonablemente cubiertos por diferentes legislaciones europeas, la legislación relativa a la eficacia en Europa, a diferencia de Estados Unidos, se encuentra aún en sus primeros estadios, entre otras razones porque los propios criterios para establecer la validez de las alegaciones de salud (*health claims*) relacionadas con los alimentos se encuentran en fase de estudio y desarrollo. A pesar de esto, actualmente se están evaluando las primeras tandas de solicitudes de alegaciones de salud.

1.1. Concepto de alimentos funcionales

Hoy día, la idea tradicional de una dieta adecuada en el mero sentido de proporcionar suficientes nutrientes que aseguren la supervivencia de un individuo, satisfacer sus necesidades metabólicas básicas y complacer su sensación de hambre es insuficiente [2-4]. Además de ello y de lo relativo a la seguridad alimentaria, el énfasis se acentúa en la posibilidad de los alimentos para promocionar la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de enfermedades. Así, el concepto de “nutrición adecuada” tiende a sustituirse por el de “nutrición óptima”, y se habla de los alimentos funcionales u otras denominaciones parecidas (*Functional Foods*, *Foods for Specific Health Use* o *Specific Health Promoting Foods*), reflejando el hecho de que algunos puedan tener una acción beneficiosa que va más allá de sus efectos nutricionales básicos.

Los alimentos funcionales presentan la característica particular de que uno o varios de sus componentes (por ejemplo los esteroides vegetales), una determinada combinación de ellos, o la ausencia de alguno(s), afecta a una o varias funciones diana en un organismo, de modo específico y positivo, produciendo un efecto fisiológico más allá del valor nutricional tradicionalmente considerado del alimento, contribuyendo así a mantener o mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de sufrir determinadas enfermedades o alteraciones [3, 5, 6].

Numerosos alimentos convencionales de los que forman parte de la dieta mediterránea tradicional pueden considerarse funcionales una vez demostradas sus propiedades. Un producto alimenticio puede ser funcional para la práctica totalidad de la población o sólo para una mayoría de personas de un subgrupo particular, por ejemplo las afectadas de un factor de riesgo cardiovascular, un desorden gastrointestinal o con sobrepeso u obesidad [1, 3, 7, 8] . Los alimentos funcionales continúan siendo alimentos, no son píldoras (en este sentido, la perspectiva europea difiere de la norteamericana que contempla más los *nutraceuticals* o *pharmafoods*) y sus efectos deben producirse con las cantidades habituales en la dieta.

La eficacia de estos alimentos funcionales debe establecerse mediante evidencias científicas suficientes, incluyendo estudios en poblaciones humanas y efectuados para cada alimento funcional en las condiciones normales de consumo humano [9]. En

particular, debe resaltarse que el consumo de alimentos funcionales no debe contribuir a alterar los hábitos alimentarios saludables, la dieta equilibrada, y que su seguridad debe estar garantizada para el conjunto de la población.

1.2. Diseño de nuevos alimentos funcionales

El diseño de un alimento funcional requiere profundos conocimientos científicos. El primer paso en la investigación y el desarrollo de un alimento funcional puede ser la identificación de un compuesto que produce un efecto específico y beneficioso para la salud (por ejemplo los esteroides vegetales), después hay que elucidar la interacción de dicho compuesto con otros elementos de la dieta y conocer su función en el organismo en diferentes ámbitos (génico, bioquímico, molecular, celular, fisiológico). Abarcar dicho conocimiento requiere una investigación básica fundamental y el conocimiento del mecanismo de acción. A partir de dicha base se puede definir un efecto saludable o beneficioso que debe demostrarse en modelos relevantes y, posteriormente, evaluar su eficacia en humanos mediante estudios que puedan demostrar una relación estadística y válida entre la ingesta y el beneficio específico que se le supone [3, 5]. La identificación y validación de biomarcadores adecuados es de gran ayuda [5], como por ejemplo las concentraciones sanguíneas de colesterol LDL respecto a las enfermedades cardiovasculares. Un aspecto importante es evaluar los márgenes de seguridad para las dosis efectivas que producen efectos beneficiosos, que deben ser seguros y aplicables a todos los principales grupos de población, incluidos aquellos a los cuales no va dirigido el eventual alimento funcional.

1.3. Evaluación de la seguridad y la eficacia de los alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son una novedad en Europa, por lo que en su desarrollo se deben tomar en cuenta marcos legislativos amplios que pueden variar dependiendo del caso. En cualquier supuesto, sin embargo, una correcta evaluación debe contemplar dos aspectos: seguridad y eficacia.

En Europa, la seguridad queda garantizada por las evaluaciones científicas que se realizan bajo la cobertura de las diferentes normas que se ocupan de controlar

cualquier novedad en alimentos y en los procesos de obtención. Respecto a la eficacia, la evolución de la situación europea se concentra en la aplicación de nuevas normas, armonizadas, sobre alegaciones de salud o de propiedades saludables.

Existen algunos ejemplos de nuevos alimentos que se consideran funcionales, como los esteroides vegetales [10, 11] que se han evaluado recientemente en Europa [12-14]. Dicha evaluación se ha concentrado en los aspectos de la seguridad, pero también en los rasgos de eficacia y posibles beneficios.

1.4. Alegaciones de salud o de propiedades saludables

A los consumidores les preocupa cada vez más la manera en que la alimentación afecta a su salud. Por ello, la industria alimentaria ha reaccionado con una información nutricional más detallada en el etiquetado, y las autoridades de Seguridad Alimentaria, regulando las declaraciones relativas a los efectos beneficiosos de algunos alimentos o componentes.

El principio fundamental que define las reivindicaciones o alegaciones de salud en los alimentos es que deben probarse científicamente, los mensajes no deben ser ambiguos y han de estar claros para el consumidor. Probablemente, la definición más acertada de “alegación” es la establecida en 1991 por el *Codex Alimentarius* [15]: “Cualquier representación que afirma, sugiere o implica que un alimento tiene ciertas características relacionadas con su origen, propiedades nutricionales, naturaleza, producción, procesado, composición o cualquier otra cualidad”. Sin embargo, el término de “alegación de salud” es interpretado de diferentes maneras según el país.

En Japón, la investigación y las aplicaciones sobre alimentos funcionales empezaron activamente ya a principios de los años 1980 y en 1986 se pusieron en práctica los primeros programas específicos. En 1991 se introdujo el concepto de “alimentos para usos específicos en el fomento de salud” (*Foods for Specified Health Use* [FOSHU]), como el de alimentos que se pueden usar para mejorar la salud de las personas y cuyo efecto específico sobre ella se puede alegar como un valor añadido. Las autoridades holandesas han sugerido más recientemente un término similar: “alimentos que promueven específicamente la salud”.

En Europa, la Comisión Europea adoptó (16 de julio de 2003) un proyecto de reglamento regulador a las declaraciones sobre propiedades nutritivas y saludables de los alimentos, incluidos los complementos alimenticios [16]. Esta propuesta de reglamento afrontaba el aportar seguridad jurídica y precisaba las condiciones de utilización de las declaraciones sobre propiedades nutritivas y saludables de los alimentos, prohibiendo algunas y evaluando la pertinencia de las alegaciones, científicamente, y considerando la utilización de éstas en función del perfil nutricional de los productos alimenticios. Desde finales de 2006, y después de varias modificaciones, la Unión Europea aprobó el reglamento definitivo [17], norma que afecta a la comunicación publicitaria y etiquetado de los mismos. La gran aportación de este reglamento consiste en la obligación de que toda alegación presente en el etiquetado deberá estar provista de la evidencia científica que la justifique. En España las competencias de cesación o rectificación de la publicidad referente a las alegaciones nutricionales son competencia de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) [18]

Las alegaciones son de dos tipos: a) alegaciones nutricionales referidas al contenido de los alimentos (responden a la pregunta ¿Qué comemos?), por ejemplo las de tipo “ricos en un componente” deberán contener al menos la cantidad mínima establecida para dicho componente) y b) alegaciones de salud o de propiedades saludables (responden a la pregunta ¿Cuáles son los efectos en el organismo?).

Sólo se pueden autorizar a escala comunitaria las declaraciones que puedan demostrarse tras haber sido objeto de una evaluación por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (<http://www.efsa.europa.eu/>). Los fabricantes de productos alimenticios tienen así la posibilidad de utilizar declaraciones pertinentes, destacando la posible influencia de un producto en la reducción del riesgo de enfermedades, y, si se produce una correcta implementación de las normas, los consumidores podrán fiarse de declaraciones claras y verificables.

La importancia de la regulación de las alegaciones de salud de los alimentos es fundamental en los desarrollos relacionados con los productos alimenticios, en muchos sentidos, dada la actual situación de pujanza, y a la vez de ambigüedad, que rodea las

alegaciones que aparecen en los anuncios, etiquetas, etc., relacionadas con la nutrición y las propiedades beneficiosas para la salud.

De este nuevo enfoque respecto a las declaraciones sobre las propiedades saludables se desprende que las informaciones relativas a los productos alimenticios y a su valor nutricional utilizadas en el etiquetado, la comercialización y la publicidad deberán ser claras, precisas y pertinentes, además de demostrables.

En su conjunto, cabe destacar que se mantiene el principio básico de la nutrición de que no existen “buenos alimentos” y “malos alimentos”, sino más bien “buenas dietas” y “malas dietas”. Todos los alimentos pueden incluirse en una dieta alimentaria variada a largo plazo.

2. INGREDIENTES LIPÍDICOS CON PROPIEDADES FUNCIONALES

Los lípidos son nutrientes ciertamente indispensables para el equilibrio alimentario, puesto que son fundamentales para el organismo, al ayudar e intervenir en múltiples funciones metabólicas esenciales, como aporte calórico en la dieta y como elementos estructurales en las membranas. No en vano, los lípidos son necesarios para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, de la piel y del aparato cardiovascular, a la vez que intervienen a nivel hormonal. Tampoco debemos olvidarnos que son los responsables de transportar las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), antioxidantes y otros nutrientes.

A pesar de todo esto, la percepción general que se tiene acerca de los lípidos o grasas no es muy favorable, ya que se les relaciona frecuentemente con enfermedades o desórdenes crónicos como la obesidad, diabetes, cáncer, y enfermedades cardiovasculares. No obstante, aunque hay algo de verdad en esta percepción, hay que ser conscientes de que la relación de los lípidos con estas enfermedades se da en un contexto de una dieta poco saludable, por lo general con un exceso de grasas, desórdenes alimenticios, factores genéticos y otros factores de riesgo (tabaquismo, alcoholismo).

Desde hace décadas, numerosos estudios han puesto de manifiesto gran cantidad de propiedades funcionales o beneficiosas para la salud de un gran número de lípidos [19], tales como esteroides vegetales, ésteres de esteroles, tocoferoles, fosfolípidos, ácidos grasos (omega 3 y 6, oleico, etc.), éteres lipídicos, determinados glicéridos, etc. Esta actividad funcional de los lípidos influye en el crecimiento y desarrollo del ser humano, especialmente en las etapas de gestación, lactancia e infancia, así como en la prevención y tratamiento de algunas patologías crónicas de base inflamatoria, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades de naturaleza autoinmune, etc. [19].

2.1. ESTEROLES VEGETALES O FITOESTEROLES

2.1.1. Definición y tipos de esteroides vegetales

Los esteroides vegetales o fitoesteroides (FT) son triterpenos con estructuras similares y funciones análogas al colesterol de los vertebrados [20]. Se caracterizan por poseer el ciclo perhidrofenantreno, el cual es un núcleo policíclico complejo que puede presentar enlaces dobles (insaturados) y ramificaciones. Sin embargo, el colesterol tiene 8 átomos de carbono en su cadena lateral, mientras que los FT más comunes tienen entre 9 y 10 átomos en dicha cadena, para un total de 28 o 29 átomos de carbono. Además esta cadena lateral alquilo puede contener un doble enlace (Figura 1).

Dentro del grupo de los esteroides vegetales encontramos dos categorías o subgrupos, los esteroides, con un doble enlace en posición 5, y los estanoles que no cuentan con dicho doble enlace, es decir, con una reducción-5 α [21] (Figura 1a y b). Los esteroides pueden ser convertidos a estanoles por hidrogenación química. Cabe destacar que dado que normalmente los estanoles son mucho menos abundantes que los esteroides, cuando se habla en términos generales de esteroides vegetales se suele hacer referencia a estos últimos.

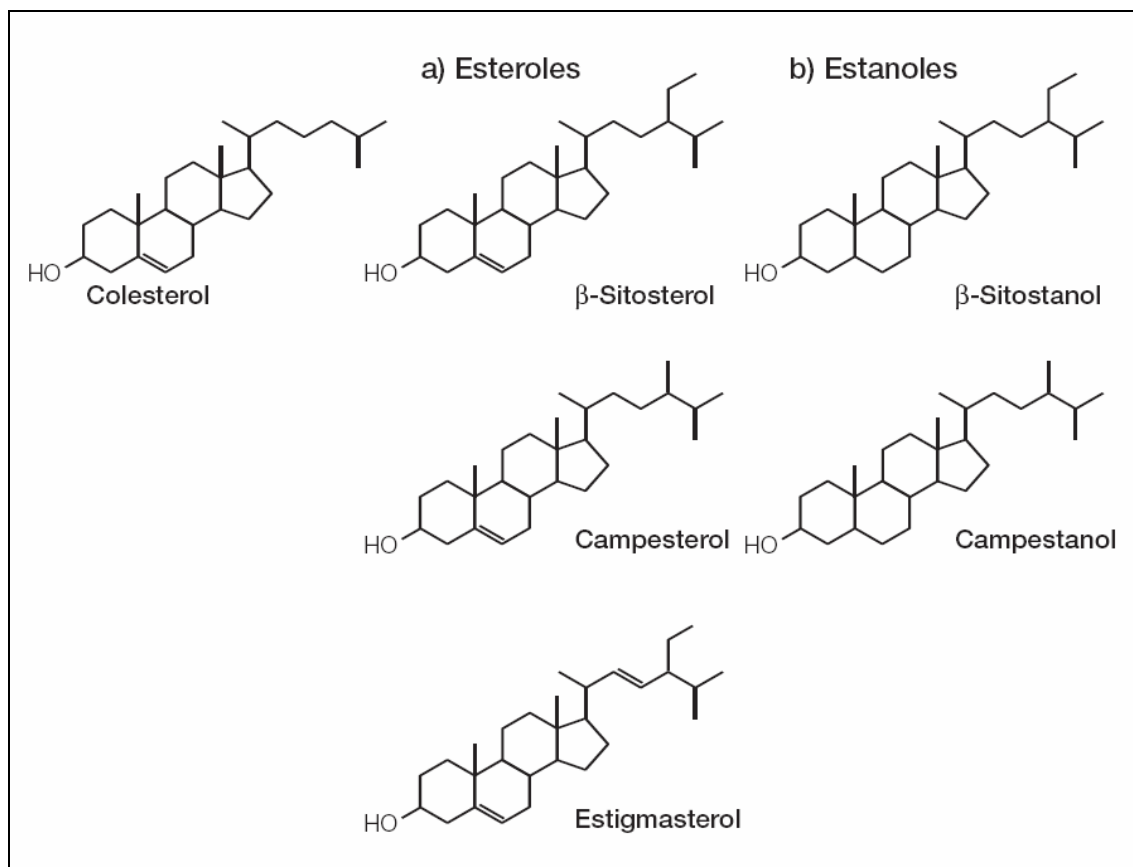


Figura 1. Estructura del colesterol y de los esteroides vegetales más comunes.

En general se cree que estas sustancias actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales, estabilizando las bicapas de fosfolípidos, a la vez que sirven de intermediarios para la biosíntesis de celulosa y numerosos productos vegetales secundarios, como los alcaloides, entre otros [22, 23].

Se han descrito más de 100 tipos diferentes de esteroides vegetales en diferentes especies de plantas, siendo el más abundante el sitosterol o β -sitosterol, seguido por el campesterol y el stigmasterol [20, 24, 25] (Figura 1a). Otros FT relevantes que se pueden encontrar en las plantas en pequeñas cantidades son el brasicasterol, D5-avenasterol, sitostanol y campestanol [20]. Las dos categorías de esteroides vegetales se reflejan en los nombres de los compuestos. Por ejemplo, el sitosterol es estructuralmente idéntico al sitostanol, excepto por el doble enlace en posición 5, y lo mismo ocurre con el campesterol y el campestanol (Figura 1b). La complejidad de los FT se incrementa debido a la asimetría estérica que presentan, ya que la adición de grupos alquilo ($-\text{CH}_3$) en la cadena lateral resulta en la aparición de estereoisómeros (moléculas con iguales proporciones relativas de átomos, pero que tienen distinta

orientación espacial), aunque generalmente la isomería no se ha tenido en cuenta en los estudios sobre esteroides vegetales.

En la naturaleza, además de en la forma libre, los FT pueden aparecer como compuestos “conjugados”, en los cuales el grupo 3β -OH del esteroide está esterificado por ácidos grasos, ferulato o ácido ferúlico (potente antioxidante semejante a la vitamina E y C), o bien glicosilados (Figura 2) [26]. Los ésteres con ácidos grasos están presentes en la mayoría de las plantas y constituyen cerca del 50% del total de esteroides en algunos alimentos, como el aceite de maíz [26] y representan los productos de almacenamiento dentro de la célula [27]; por su parte, los ésteres de ferulato también aparecen en cantidades apreciables en muchos alimentos [28], mientras que los esteroides vegetales glicosilados son un componente minoritario en los alimentos vegetales, salvo algunas excepciones, ya que constituyen el 82% del total de los esteroides vegetales de las patatas [29].

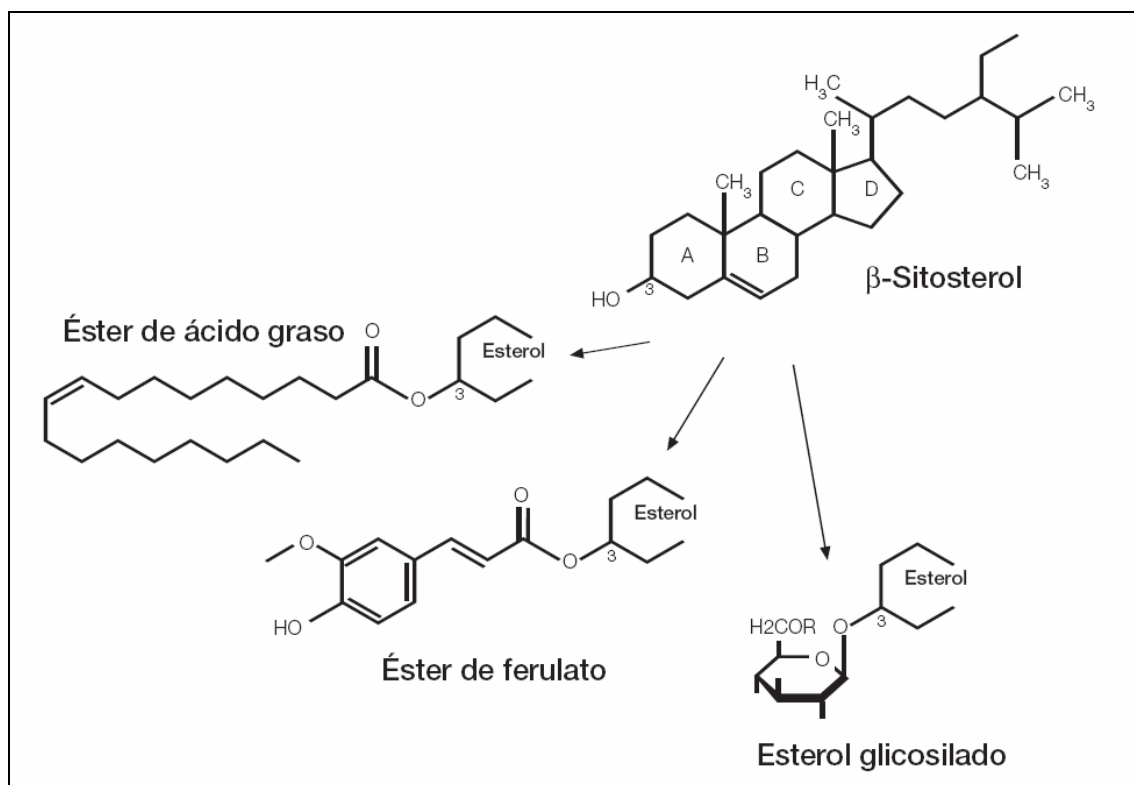


Figura 2. Modificaciones del grupo 3β -hidroxilo de los esteroides vegetales.

Al contrario que los esteroides o estanoles libres, que son cristalinos y muy poco liposolubles, las formas esterificadas se disuelven fácilmente en alimentos que contengan grasa [30]. Los FT esterificados con ácidos grasos son 10 veces más solubles en aceites que los FT libres. El orizanol (fitoesterol esterificado con ácido ferúlico) debido al grupo alcohol del ferúlico tiene una cierta polaridad y es solo 2 veces más soluble en aceites que los FT, pero se puede disolver más fácilmente en medios acuosos.

2.1.2. Fuentes de esteroides vegetales e ingesta

Prácticamente todos los alimentos vegetales contienen cantidades apreciables de esteroides vegetales. En la Tabla 1 se muestran los valores del contenido total de FT en alimentos representativos [31]. La fuente más concentrada son los aceites vegetales vírgenes o no refinados, como los de germen de trigo, maíz, girasol, soja y colza (que contienen entre un 0,1% y 0,8%), de tal manera que una persona que consuma al día 30 g de aceite de maíz estaría ingiriendo alrededor de 300 mg de FT, una cantidad que se ha demostrado ya posee alguna eficacia a la hora de reducir la absorción de colesterol [28]. Una excepción es el aceite de palma, que es deficiente en esteroides vegetales tras el proceso de refinado¹ [32]. También se encuentran en legumbres (0,2%) y, en menor cantidad, en frutos secos, pan y vegetales. Cabe decir que, con excepción de los carbohidratos altamente refinados y los productos animales, casi todos los otros alimentos contribuyen de manera apreciable a la ingesta de FT.

¹ Es inevitable que durante la desodorización y refinado físico de los aceites a alta temperatura se produzcan algunas pérdidas por evaporación de tocoferoles y esteroides. Las pérdidas totales del refinado (incluido el pretratamiento) son de aproximadamente el 25-35 por ciento. Muchos investigadores proporcionan datos similares para muchos aceites. Las pérdidas tienden a ser mayores en el refinado físico que en el alcalino debido a que son más elevadas las temperaturas de arrastre. El aceite de palma crudo tiene un bajo contenido de FT, por eso tras el refinado es uno de los aceites más deficientes en estos compuestos.

Tabla 1. Contenido total de esteroides vegetales en alimentos representativos. Fuente: adaptación de [31]

ALIMENTO	Fitoesteroides Total (mg/100g)	ALIMENTO	Fitoesteroides Total (mg/100g)
<u>Aceites y grasas</u>			
Aceite de germen de trigo	919	Harina de arroz	23
Aceite de maíz	909	Corn Flakes	22
Aceite de colza	668	Arroz inflado	20
Aceite de girasol	411	<u>Frutas</u>	
Aceite de soja	320	Fruta de la pasión	44
Aceite de cacahuete	258	Naranjas	24
Aceite de semilla de uva	215	Higos	22
Margarina	217 (92-721)	Limones	18
Aceite de oliva	154	Pomelos	18
Aceite de palma	39	Piñas	17
<u>Nueces y semillas</u>		Clementinas	16
Semillas de sésamo	360	Melocotones	15
Semillas de girasol	300	Manzanas	13
Pistachos	276	Peras	12
Almendras	183	Kiwi	9
Avellanas	138	Melones	2
Nueces	127	Sandías	1
Cacahuetes	104	<u>Hortalizas</u>	
<u>Cereales</u>		Aceitunas negras	50
Germen de trigo	344	Coles de Bruselas	43
Salvado de trigo	200	Coliflores	40
Harina de trigo sarraceno	99	Brócoli	39
Pan de trigo integral	86	Aceitunas verdes	35
Harina de centeno	86	Setas	18
Harina de trigo integral	70	Apio	17
Trigo	69	Zanahorias	16
Centeno	69	Hinojo	10
Galletas	67	Cebollas	8
Muesli	63	Puerros	8
Pan	44	Pimientos verdes	7
Arroz	30	Tomates	5
Harina de trigo	28	Patatas hervidas	4

En las dietas occidentales la ingesta diaria de estas sustancias se estima en unos 150-400 mg, aproximadamente la misma que la ingesta de colesterol, siendo mayor en algunas dietas vegetarianas y en la dieta japonesa, en las cuales puede llegar a 300-500 mg/día [33, 34] (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los aspectos fisiológicos del colesterol, fitoesteros y fitoestanoles

	Colesterol	Fitoesteros	Fitoestanoles
Ingesta alimentaria	300-500 mg/día	150-400 mg/día Vegetarianos: más de 1000 mg/día	< 10 mg/día
Fuentes	Huevos, mantequilla, productos lácteos, carne	Aceites vegetales, nueces, semillas, granos.	Aceite de coco, aceite de coníferas y algunos aceites vegetales
Síntesis endógena	Colesterol biliar: 800- 1200 mg/día	No son sintetizados	No son sintetizados
Tasa de absorción	40-60%	< 5%	0,1-2%
Concentración plasmática	140-320 mg/dl	0,3-1,7 mg/dl	0,3-0,6 mg/dl
Tasa de excreción	40-60%	> 95%	>98%

Aunque no se han estudiado tanto como los esteroides, los estanoles aparecen también, en niveles traza, en muchas especies de plantas y en relativamente altas concentraciones sólo en unas pocas especies de cereales, habiéndose sugerido que pueden representar cerca del 10% de la ingesta total de FT [35]. Sin embargo, tal como se ha comentado con anterioridad, los estanoles son los equivalentes hidrogenados de los esteroides, por lo que, además de sus fuentes naturales, pueden obtenerse por hidrogenación química de estos últimos.

A nivel industrial, las principales fuentes de FT utilizadas para su incorporación en los productos comerciales son los aceites vegetales (sobre todo subproductos de la producción de aceite de soja) y la resina líquida o *tall oil*² [36, 37]. Independientemente de la fuente, los FT obtenidos se han utilizado en diversas áreas, como la farmacéutica (producción de esteroides terapéuticos), en nutrición (como ingredientes

² *Tall oil*, también llamada resina líquida o tallol, es un líquido viscoso, de color amarillo-negro, oloroso, obtenido como subproducto del proceso Kraft de fabricación de pasta de madera, principalmente a partir de coníferas. El nombre proviene del término sueco tallolja ("aceite de pino") y es un subproducto químico importante en la fabricación de papel: 30 a 50 kg / tonelada de pulpa, lo que puede llegar a contribuir entre el 1.0 - 1,5% de los ingresos de las fábricas si no se utiliza internamente. Puede contener hasta un 80% de β -sitosterol y un 20% de estanoles.

hipocolesterimiantes en alimentos funcionales) y en cosmética (cremas, lápiz de labios) [25, 38].

2.1.3. Papel fisiológico del colesterol

El colesterol (Figura 3) es el esteroide predominante en animales y desempeña importantes funciones en el organismo: es precursor de la vitamina D, de hormonas esteroideas y sales biliares. Es también un componente importante de las membranas biológicas y forma parte de las lipoproteínas circulantes. El colesterol en nuestro organismo es aportado exógenamente (dieta) y es sintetizado en parte endógenamente mediante un proceso complejo y costoso energéticamente que permite complementar las concentraciones de colesterol procedentes de la dieta. El proceso biosintético del colesterol ocurre principalmente en el hígado a partir de acetil coenzima A (acetil-CoA) y la etapa limitante de esta vía metabólica es el paso de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato, reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa (Figura 4). Las estatinas, compuestos con estructura semejante al mevalonato, son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa y, por tanto, reducen la síntesis de colesterol endógeno; por este motivo se utilizan con éxito para el tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia. Estudios recientes han asociado diferentes variantes polimórficas del gen de la HMG-CoA reductasa con diferentes respuestas al tratamiento con estatinas [39].

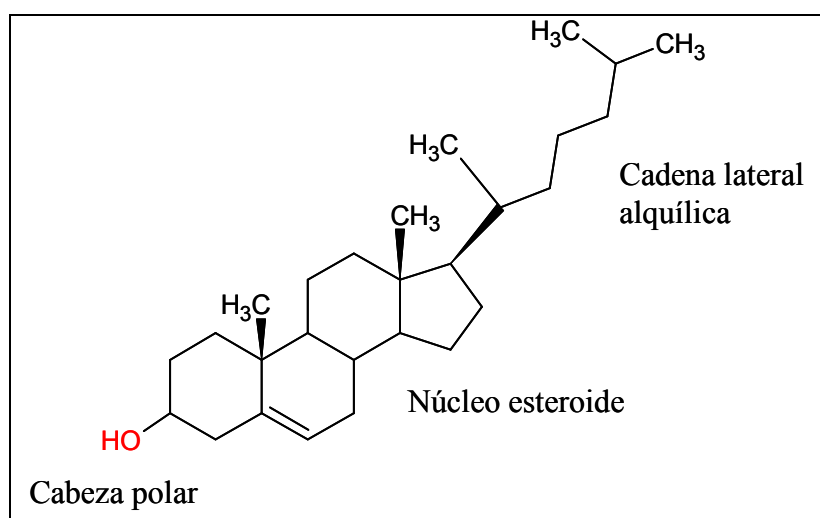


Figura 3. Estructura del colesterol

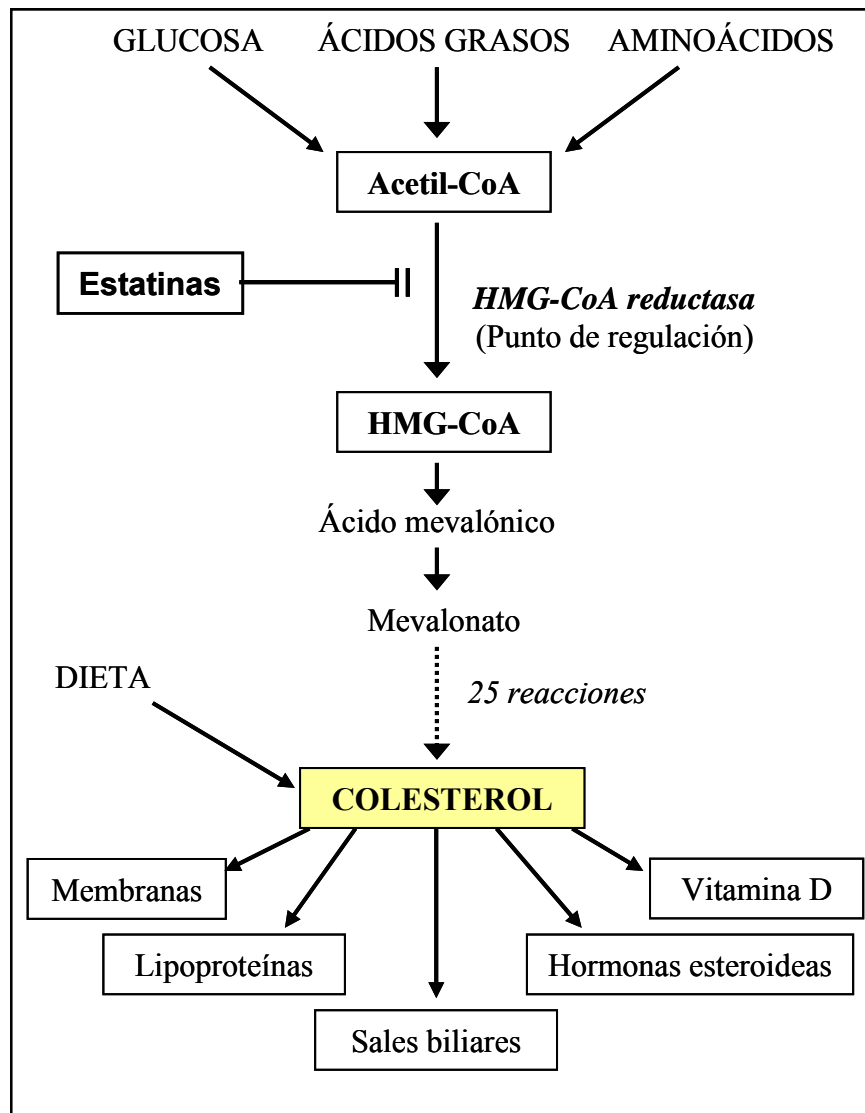


Figura 4. Proceso biosintético del colesterol y sus principales funciones.

Colesterol y aterosclerosis

La enfermedad cardiovascular es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y se prevé que continúe siéndolo en las próximas décadas [40, 41]. En España, dicha enfermedad representa casi el 40% de las defunciones [42]. Las principales manifestaciones son el infarto de miocardio y el infarto cerebral, y representan las secuelas clínicas de un proceso vascular sistémico conocido como aterosclerosis.

La aterosclerosis es un proceso insidioso que puede persistir muchos años antes de que las manifestaciones clínicas sean evidentes. Esto se debe a que los procesos

implicados en la aterosclerosis requieren una exposición prolongada a los factores de riesgo. En general, son sólo las últimas etapas de la enfermedad las que progresan rápidamente y conducen a las manifestaciones clínicas.

Estudios epidemiológicos desarrollados en los últimos 40 años han aportado luz sobre la incidencia de la enfermedad cardiovascular en el mundo occidental. Estos hallazgos se relacionan con el hecho de que la aterosclerosis es una enfermedad asociada al envejecimiento, si bien una aterosclerosis prematura puede precipitarse por un número de factores primarios de riesgo, como un exceso de colesterol LDL (colesterol en lipoproteínas de baja densidad o *Low-Density Lipoprotein*), diabetes mellitus, hipertensión y hábito de fumar [43]. Otro factor importante de riesgo es una historia de aterosclerosis prematura en un familiar de primer grado. Un exceso de colesterol LDL es el principal factor de riesgo identificado y el que ha recibido más atención, siendo al mismo tiempo la diana para el control del riesgo de enfermedad cardiovascular con agentes que disminuyen el colesterol. Otros factores de riesgo secundarios incluyen el estrés, la falta de ejercicio, la obesidad, la hipertrigliceridemia, etc. Debe señalarse que el término “factor de riesgo” se utiliza deliberadamente en lugar de “causa de riesgo”, ya que los estudios epidemiológicos no pueden identificar exactamente la naturaleza de las relaciones que se establecen entre diversos factores y la génesis del proceso aterosclerótico.

La asociación de los lípidos plasmáticos, y principalmente las concentraciones de colesterol, con la enfermedad aterosclerótica fue uno de los primeros descubrimientos realizados en este sentido, que posteriormente se ha ido corroborando por un gran número de estudios epidemiológicos. En la actualidad se considera que la relación entre el colesterol y la aterosclerosis es inequívoca, y las concentraciones de colesterol sérico (particularmente las de colesterol LDL) son el principal factor primario causante de la enfermedad cardiovascular [44]. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que los títulos elevados de colesterol causan un 18% de los accidentes vasculares cerebrales y un 56% de las cardiopatías isquémicas mundiales [41]. En conjunto, esto desencadena alrededor de 4,4 millones de defunciones al año (un 7,9% del total). La reducción de las concentraciones circulantes de colesterol, en concreto de colesterol LDL, retrasa e incluso revierte la progresión de las placas ateroscleróticas [45] y la incidencia de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular [46].

La incidencia de hipercolesterolemia es, en general, elevada. Por ejemplo, en Estados Unidos, aproximadamente un 50% de la población con edades comprendidas entre los 20 y 74 años tienen concentraciones séricas de colesterol que exceden los 200 mg/dl [43]. En España, la prevalencia de hipercolesterolemia es también elevada: en personas de 35 a 64 años de edad, el 18% (18,6% en los varones y 17,6% en las mujeres) tiene una colesterolemia igual o superior a 250 mg/dl y el 57,8% (56,7% en los varones y el 58,6% en las mujeres) igual o superior a 200 mg/dl [42]. En las mujeres se produce un incremento en la prevalencia de hipercolesterolemia con la edad que no se aprecia en los varones [42]. La relación entre las concentraciones séricas de colesterol y el riesgo de enfermedad coronaria parece ser lineal, y un incremento del 1% en el colesterol sérico se corresponde con un aumento del 2% en el riesgo de dicha enfermedad [47].

El riesgo de enfermedad coronaria puede disminuirse de manera importante con una terapia encaminada a descender los títulos de colesterol, terapia que desde los últimos 15 años se desarrolla con notable éxito gracias al desarrollo farmacológico de inhibidores de la enzima clave en la biosíntesis de colesterol, HMG-CoA reductasa.

Lipoproteínas circulantes y metabolismo del colesterol

Debido a la insolubilidad de los lípidos en medio acuoso, y para facilitar su transporte en el plasma sanguíneo, estos se asocian con proteínas y forman unas estructuras supramoleculares que se conocen con el nombre de lipoproteínas. Las lipoproteínas constan de un núcleo hidrofóbico formado por triacilglicerolos y ésteres de colesterol, rodeado de una envoltura organizada en una monocapa y formada por lípidos polares (fosfolípidos y colesterol libre) y por proteínas (Figura 5). Las proteínas que constituyen las lipoproteínas reciben el nombre de apoproteínas y cumplen una función estructural, solubilizando los lípidos, y además regulan la ruta metabólica de las diferentes lipoproteínas al servir de cofactores enzimáticos y por interaccionar y ser reconocidas por receptores específicos localizados en las membranas celulares.

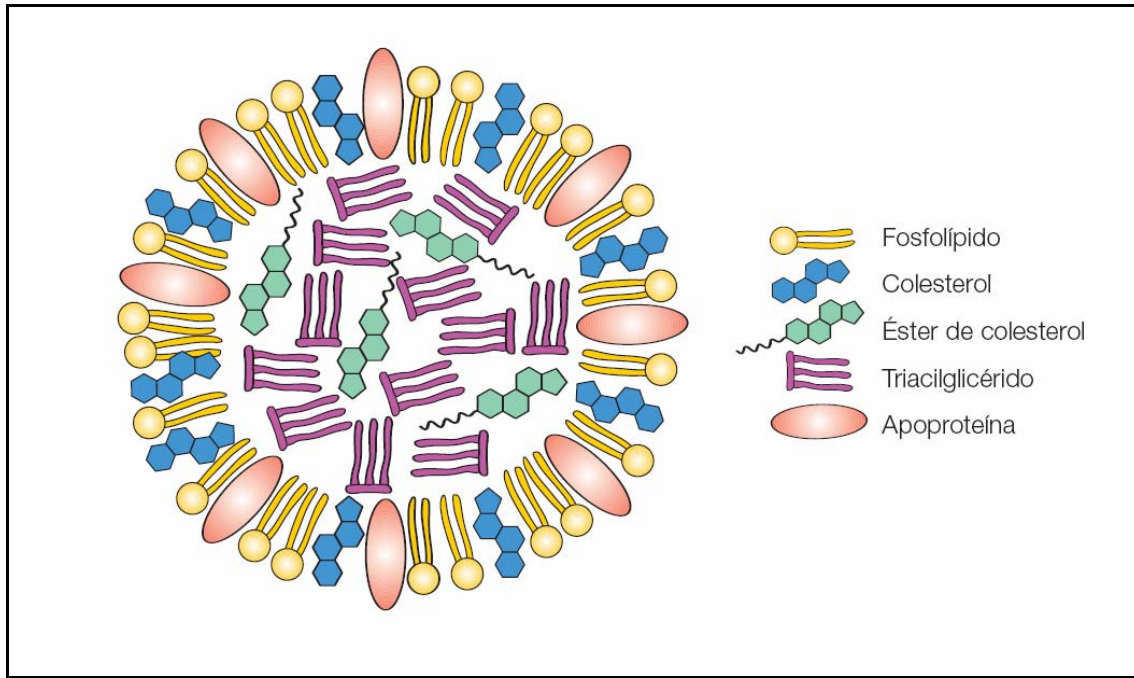


Figura 5. Estructura general de una lipoproteína

Las lipoproteínas pueden separarse según su densidad en cuatro familias diferentes [48]: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las lipoproteínas del plasma difieren entre sí respecto a su contenido lipídico y también según las apoproteínas que contienen (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de las principales lipoproteínas del plasma humano [48]

<i>Composición de las principales lipoproteínas del plasma humano</i>				
	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
Densidad (g/ml)	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,063	1,062-1,21
Diámetro (nm)	> 70	30-90	18-22	5-12
Lípidos (%)	98	92	78	50
Triglicéridos (%)	86	55	6	4
Fosfolípidos (%)	7	18	22	22
Colesterol libre (%)	2	7	8	4
Colesterol éster (%)	3	12	42	20
Proteínas (%)	2	8	22	50
	A-IV, B-48, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E

El principal transportador del colesterol en la sangre son las LDL y sus concentraciones se han asociado claramente con el desarrollo de la enfermedad

cardiovascular [44]. Por otra parte, el colesterol procedente de la dieta es transportado desde el intestino hasta el hígado a través de los quilomicrones. A continuación se describe brevemente el metabolismo circulante del colesterol (Figura 6) [49].

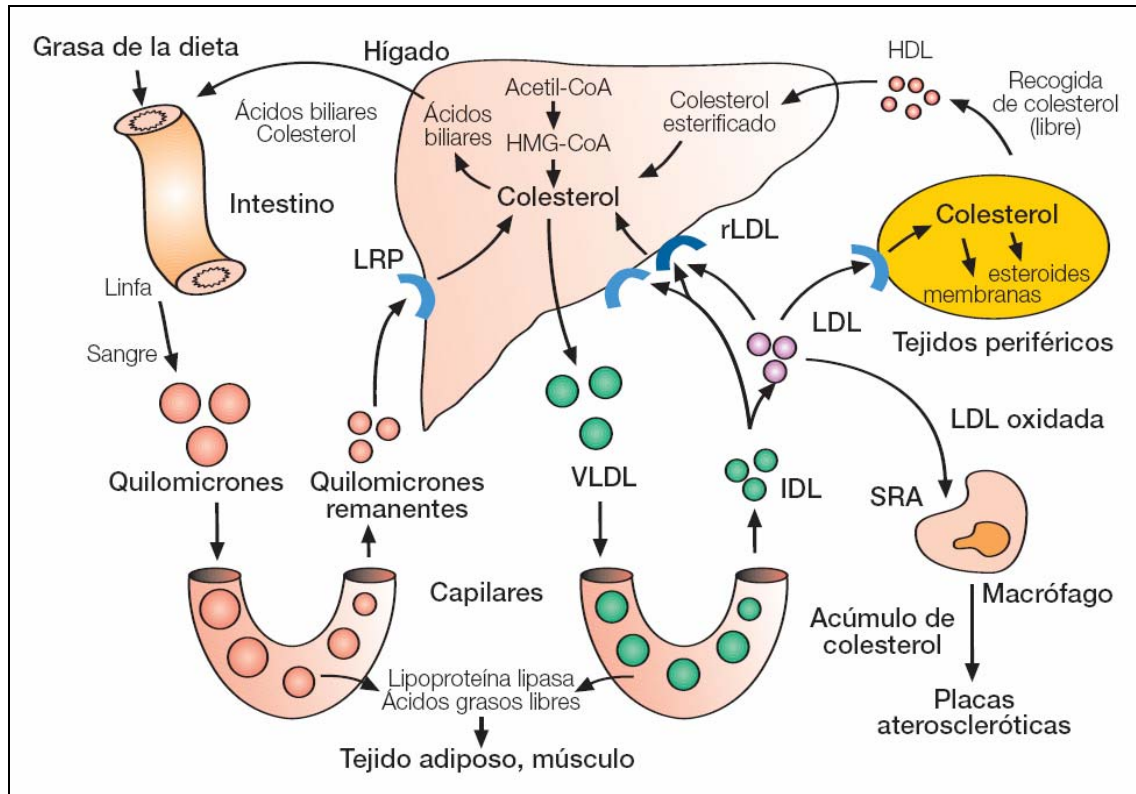


Figura 6. Metabolismo del colesterol circulante.

2.1.4. Efectos potenciales de los esteroides vegetales sobre el metabolismo del colesterol: mecanismos de acción

Hay una gran cantidad de evidencias experimentales que han demostrado que los esteroides vegetales tienen un importante efecto hipocolesterolémico, reduciendo tanto las concentraciones de colesterol total como las de colesterol LDL [50]. En cuanto al mecanismo de acción se han propuesto diferentes posibilidades. Los esteroides vegetales afectan a la absorción intestinal de colesterol, a su síntesis, y a los sistemas de eliminación [51] (Figura 7). Más adelante serán revisados cada uno de estos puntos de manera algo detallada, haciendo primero un breve repaso del proceso de absorción del colesterol y los esteroides vegetales en el intestino.

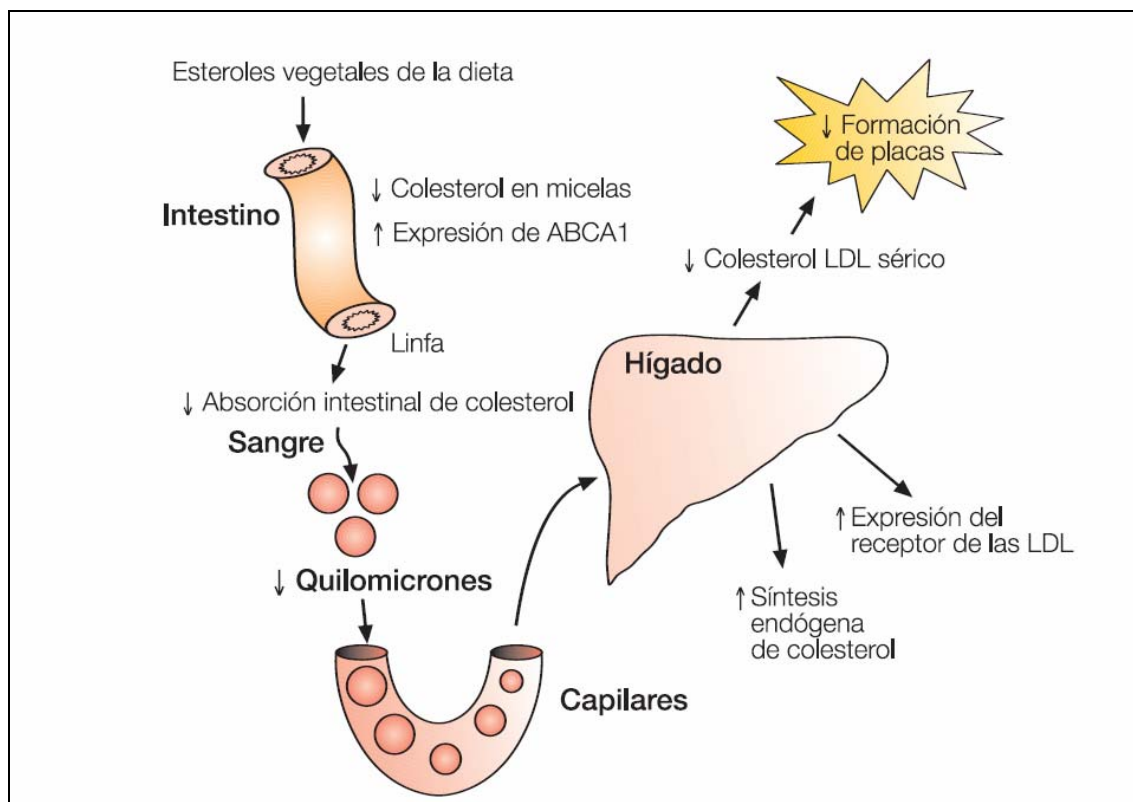


Figura 7. Posibles efectos de los esteroides vegetales en el metabolismo lipídico y lipoproteico [51].

Absorción intestinal de colesterol y metabolismo lipoproteico

El colesterol, tanto el procedente de la dieta como el biliar, se absorbe entre un 35% y un 70% en el intestino. Para la absorción, por un proceso no totalmente esclarecido (aunque se piensa que está involucrado el transportador NPC1L1, ver Figura 9, pág. 31), se forman unas micelas compuestas por mezclas de colesterol libre, mono y diacilglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos y sales biliares [52]. Una vez en el enterocito, el colesterol libre es esterificado por la acil-coenzima A colesterol acil-transferasa (ACAT) y es incorporado en los quilomicrones (Figura 6). Éstos pasan a la circulación y se convierten en quilomicrones remanentes por acción de la lipoproteína lipasa [53], que son captadas por el hígado. En el hígado se originan las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que pueden convertirse en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y éstas a su vez en lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL tienen un elevado contenido en colesterol y pueden ser eliminadas de la circulación mediante el receptor de LDL (LDLr), siendo ésta la forma en que las células captan el colesterol. Es de destacar que el colesterol libre puede ser transportado de nuevo desde

el hígado hacia el intestino para su eliminación a través de una serie de transportadores de esterol, los ABC (*ATP-binding cassette*), tales como ABCA1, ABCG5 y ABCG8 presentes en las células intestinales, y que desempeñan un importante papel en la eficacia de absorción neta de colesterol [54].

Las células regulan estrechamente su concentración de colesterol libre intracelular mediante el reflujo mediado por los transportadores ABC, de la captación de LDL y de la síntesis endógena de colesterol [55].

Absorción intestinal de esteroides vegetales

A pesar de que su estructura química es similar, los esteroides vegetales y el colesterol difieren marcadamente en lo que respecta a su absorción intestinal. Ambos esteroides son transportados al interior del enterocito por el transportador NPC1L1, pero a diferencia del colesterol, los FT se absorben poco en el intestino (0,4%-3,5%) y los estanoles aún menos (0,02%-0,3%). Una posible explicación a esta baja absorción es que la ACAT presenta una baja afinidad por los FT, por lo que, aunque entran en el enterocito, resultan poco esterificados, y a los quilomicrones tan sólo se incorporan los esteroides y estanoles esterificados [56]. También se ha sugerido que la tasa de absorción de esteroides vegetales podría verse influida por la longitud de la cadena lateral y, en el caso de los esteroides, por la presencia del doble enlace en posición 5 [57]. A una menor absorción de los estanoles podría contribuir su menor concentración en la que aparecen en las plantas, ya que la concentración de esteroides es unas 10 a 30 veces mayor que las de estanoles [56].

Un factor que puede afectar a la menor tasa de absorción de los FT, en comparación con el colesterol, es el funcionamiento de unos transportadores que permiten el reflujo de esteroides del intestino, los transportadores ABC (ABCG5/8). Estos transportadores intestinales eliminan colesterol y sitosterol para evitar su absorción y acumulación, aunque su funcionamiento es mucho más eficaz en el caso del sitosterol, devolviendo gran parte de este esteroide presente en el enterocito de nuevo al intestino para su eliminación [58].

De hecho, las mutaciones y determinados polimorfismos en genes que codifican para los transportadores ABCG5 o ABCG8 pueden desencadenar la aparición de fitosterolemia [59]. La fitosterolemia o sitosterolemia es una rara enfermedad hereditaria recesiva caracterizada por la absorción de cantidades masivas de esteroides vegetales [60] y una baja excreción de los mismos, lo que resulta en una acumulación de estos compuestos en plasma y tejidos. Se caracteriza por la aparición de xantomas tendinosos, enfermedad coronaria prematura (sobre todo en los jóvenes), episodios hemolíticos, artritis y artralgias [61]. Estudios con pacientes sitosterolemicos han demostrado que la absorción de FT aumenta entre 3 y 4 veces [62]. Los pacientes con sitosterolemia tienen mutaciones en ABCG5 y ABCG8 (que se expresan en el intestino y el hígado), lo que repercute en un reducido transporte de FT de los enterocitos a la luz intestinal y reduce la secreción de estos compuestos en la bilis [59]. Los niveles plasmáticos de los FT en estos pacientes son de 7% al 16% de la concentración de colesterol total en plasma.

Efectos de los esteroides vegetales sobre la absorción intestinal de colesterol

El efecto más estudiado de los esteroides vegetales es su inhibición de la absorción intestinal de colesterol, tanto procedente de la dieta (unos 300 mg/día) como colesterol endógeno recirculante procedente de la bilis (unos 1000 mg/día), que puede ser parcialmente reabsorbido en el intestino siendo, de hecho, la principal forma de recaptación [55]. Los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden desplazarlo de las micelas de absorción, habiéndose demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que de esta manera se produce una disminución, por competición, de la incorporación del colesterol en las micelas [51, 63], y, en consecuencia, disminuye su absorción intestinal. A dosis máximas de esteroides vegetales la absorción de colesterol disminuye de un 30% a 50% [64].

Durante años se ha sugerido que el colesterol en el intestino, que ya de por sí es poco soluble, co-cristaliza y es precipitado en presencia de esteroides vegetales, siendo por tanto no absorbible o menos absorbible [65], aunque un estudio reciente ha demostrado que es poco probable que la formación de estos cristales poco solubles afecten a la absorción del colesterol [66].

Efectos de los esteroides vegetales sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico

Además de estos mecanismos de competición, los importantes avances en el conocimiento de la absorción del colesterol han aportado posibles dianas moleculares para los FT, sugiriendo que podrían regular las proteínas implicadas en el metabolismo del colesterol, tanto en enterocitos como en hepatocitos. Esta regulación estaría mediada por los receptores nucleares X del hígado (LXR). El descubrimiento de los ligandos endógenos de LXR ha establecido la importancia de estos receptores nucleares en el metabolismo hepático de colesterol (Figura 8).

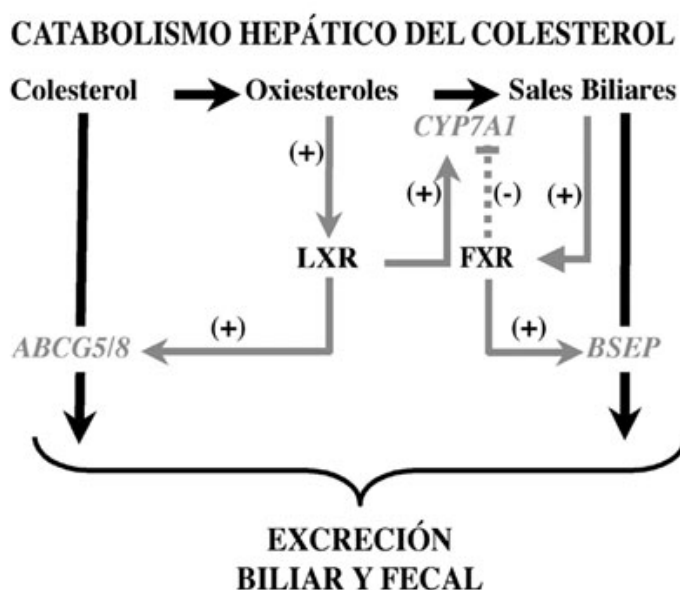


Figura 8. Catabolismo hepático del colesterol.
BSEP: bomba exportadora de sales biliares (*bile salt export pump*).

El reciente descubrimiento de la implicación de los transportadores ABC en la absorción del colesterol ha permitido explorar aún más el mecanismo hipocolesterolémico de los esteroides vegetales. Algunos estudios hallaron que las mezclas de micelas enriquecidas con sitostanol o con colesterol más sitostanol eran potentes inductores de la expresión del transportador ABCA1 y ABCG5/G8 en las células caco-2, un modelo aceptado para el estudio de aspectos del metabolismo intestinal humano. Basándose en estos resultados, los autores parten de la hipótesis que los estanoles (y posiblemente los esteroides) podrían ser potentes agonistas de los LXR, los cuales aumentarían la transcripción (y por tanto los niveles) de estos transportadores

ABC, aumentando la excreción de colesterol [58, 67-69] (Figura 9). Sin embargo, otros estudios con ratones ABCA1 y ABCG5/G8-deficientes sugieren que la reducción intestinal del colesterol por parte de los FT es independiente de estos transportadores ABC [70-72].

Varios estudios han propuestos otros mecanismos moleculares independientes de los LXR por los cuales los esteroides vegetales podrían afectar al metabolismo del colesterol (Figura 9). Estos incluyen:

- La reducción de la tasa de esterificación del colesterol en el enterocito (afectando a la actividad de la ACAT) [73, 74] y, consecuentemente, de esta forma se reduciría la cantidad de colesterol exportado a la sangre en forma de quilomicrones.
- La reducción de la absorción de colesterol por la inhibición del transportador NPC1L1 intestinal [75, 76].
- La reducción de la síntesis de novo de colesterol por inhibición de la HMG-CoA reductasa y la C-24-reductasa [77-80].
- La eliminación del contenido de apoB100 de las lipoproteínas (lo que afecta a la interacción con los LDLr) [81].

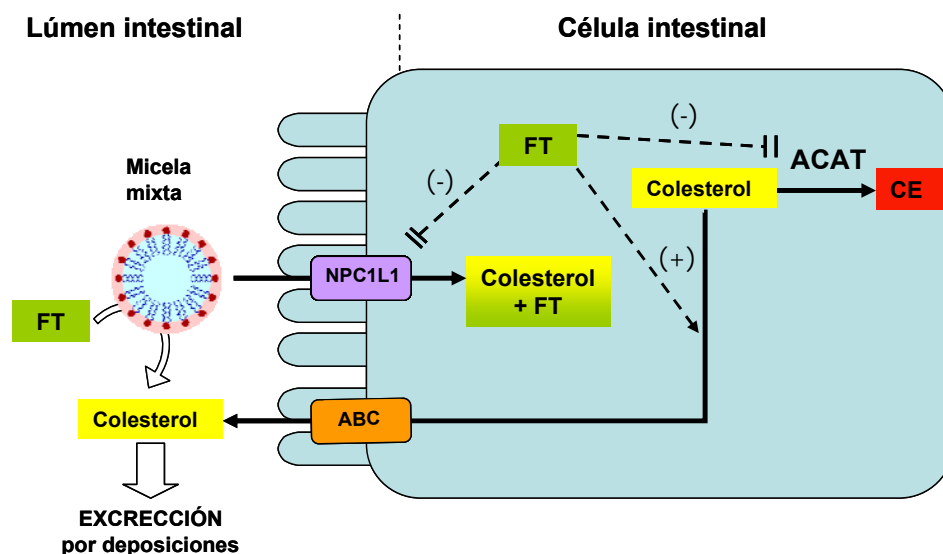


Figura 9. Esquema de algunos de los sitios de acción de fitoesteroides/fitoestanoles (FT). 1.- Los FT pueden desplazar el colesterol de las micelas. 2.- El transportador NPC1L1 es de crucial importancia para el proceso de asimilación de colesterol y FT (aproximadamente el 50% del colesterol de la dieta se absorbe en el intestino delgado. En cambio, sólo se absorben pequeñas cantidades de FT). 3.- Después de la captación por el

enterocito, los esteroides son principalmente esterificados con ácidos grasos para formar ésteres de colesterol (CE), una reacción catalizada por ACAT. Posteriormente, los ésteres de colesterol pueden ser secretados a la linfa tras ser empaquetados en quilomicrones que contienen apoB48, llegando, finalmente, al hígado. 4.- Los esteroides no esterificados se excretan de vuelta al lumen intestinal por el heterodímero ABCG5/G8.

Sin embargo, el impacto del consumo de FT sobre estos procesos fisiológicos *in vivo* no está del todo claro, por eso, en la actualidad, se continúan estudiando estos y otros mecanismos adicionales que expliquen el efecto reductor de las concentraciones sanguíneas de colesterol por parte de los esteroides de la dieta.

Lo que si está claro es que la inhibición de la absorción de colesterol produce una relativa deficiencia de colesterol, en respuesta a la cual se produce un incremento en la síntesis endógena que no llega a compensar el descenso de colesterol producido al inhibirse su absorción. Lo mismo ocurre con la síntesis del receptor de las LDL de la circulación, que también aumenta [82, 83]. Este hecho incrementa la eliminación de las LDL y también de las IDL de la circulación, y dado que éstas son las precursoras de las LDL, de esta manera desciende además su producción [84], sin verse afectadas las concentraciones de triglicéridos ni de colesterol HDL [37, 85]. Tras la ingestión de esteroides vegetales disminuyen, por tanto, las concentraciones de colesterol LDL, pero también las de colesterol total debido a la menor absorción y pese al incremento compensatorio en su síntesis [86, 87], incluso en individuos que ya ingieren bajas cantidades de colesterol en la dieta [88]. Este efecto se observa tanto con esteroides vegetales libres como esterificados [89].

Al usar esteroides vegetales solubilizados de manera correcta, y dependiendo de la matriz en que se encuentran, las concentraciones de colesterol LDL descienden de manera coherente en los estudios clínicos. Por ejemplo, una ingesta diaria de esteroides vegetales esterificados de 2–3 g produce la menor tasa de absorción de colesterol (pese a una mayor tasa de síntesis endógena) y la expresión más elevada del receptor LDL, lo cual da como resultado, en conjunto, un descenso del colesterol LDL de entre un 8 – 15% [25, 37], mientras que dosis mayores no se asocian a un efecto superior [21, 25] (Figura 10). Es interesante destacar que el efecto reductor de las LDL es el mismo tanto si se ingiere una determinada cantidad de esteroides vegetales dos a tres veces al día como si se ingiere de una sola vez [90].

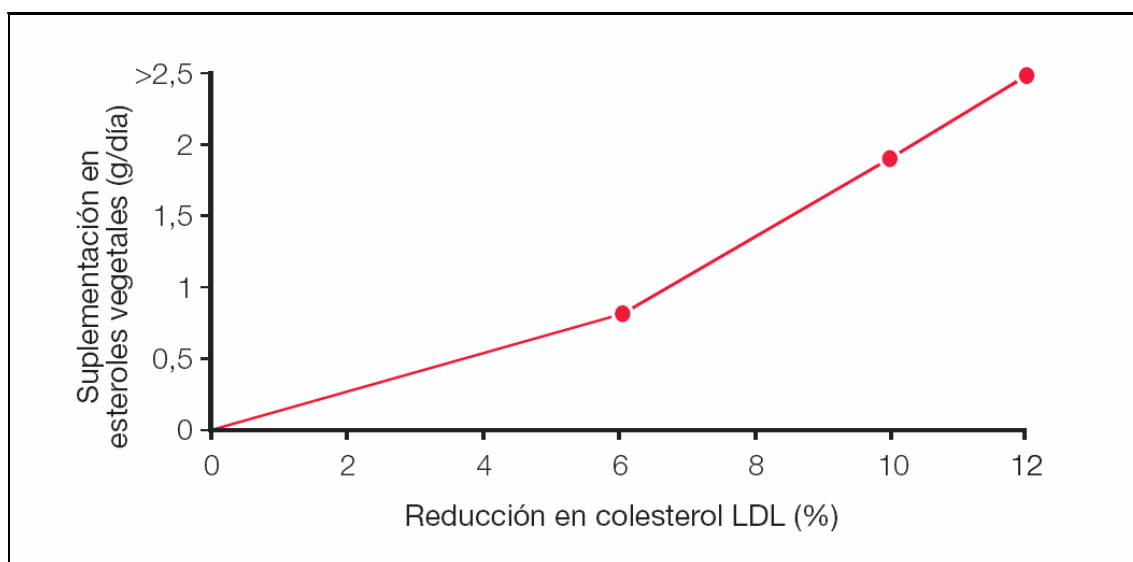


Figura 10. Reducción de las concentraciones de colesterol LDL respecto a la ingesta diaria de esteroides vegetales esterificados [21].

Siguiendo con el metabolismo lipídico, el colesterol se excreta de nuestro organismo principalmente como colesterol no esterificado en la bilis. Hasta el momento los datos en cuanto al efecto de los FT sobre el metabolismo biliar no son concluyentes, aunque algunos estudios sugieren que producen un incremento en la excreción de ácidos biliares [51].

Efectos de los esteroides vegetales sobre la lesión aterosclerótica y la disfunción endotelial

Las concentraciones elevadas de colesterol LDL son un conocido factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis [91], por lo que el descenso en ellas que produce la ingesta de esteroides vegetales podría asociarse a una disminución en el riesgo de padecer dicha enfermedad. En roedores sí que se ha observado un descenso en la formación de la placa aterosclerótica tras la ingestión de FT en la dieta [92, 93]. Pero, si bien se ha observado una reducción en la progresión de la lesión aterosclerótica, no existen estudios concluyentes sobre un posible efecto en la regresión de dicha lesión.

Respecto al posible uso de esteroides vegetales para prevenir la enfermedad cardiovascular resulta interesante la posibilidad de combinar la ingesta de FT con una terapia química con estatinas, ya que estaríamos combinando el efecto de ambos: los FT

disminuyendo la absorción e incrementando la eliminación de colesterol y las estatinas reduciendo la biosíntesis de colesterol [94].

Estudios *in vitro* sugieren que los esteroides vegetales podrían afectar a la formación de la placa aterosclerótica por otros mecanismos. Así, se ha observado un retraso en el crecimiento y la proliferación de las células musculares lisas (que es importante en los primeros estadios de formación de la placa) en presencia de sitosterol y campesterol [95].

La disfunción endotelial es un trastorno sistémico y una variable clave en la patogénesis de la aterosclerosis y sus complicaciones [96]. Un estudio reciente evaluó si el consumo de FT podía mejorar la salud arterial. El consumo de FT redujo en un 9% el colesterol LDL en comparación con el grupo control, sin embargo, no hubo ningún efecto sobre la elasticidad arterial y la función endotelial. Aunque, en un estudio con 200 pacientes con calcificación de la arteria carótida (CAC) y baja vasodilatación del endotelio dependiente de flujo arterial, el grupo con la dieta suplementada con FT mejoró en comparación con los controles [97]. Estos resultados apoyan la necesidad de más estudios para comprobar si FT puede inducir cambios clínicamente significativos en pacientes con disfunción endotelial.

2.1.5. Formulación o modos de administración de esteroides vegetales

Habida cuenta de los beneficios de los esteroides vegetales, y dado que no están presentes en cantidad suficiente en la dieta típica, los FT tienen que ser administrados como un suplemento, con una formulación adecuada. Dada la naturaleza hidrofóbica de los FT libres, son poco solubles en el tracto digestivo y su administración está lejos de ser sencilla, dado que son prácticamente insolubles en agua y ligeramente solubles en aceites comestibles [98, 99]. El principal avance en este ámbito se produce con el descubrimiento de que la esterificación de esteroides con ácidos grasos (ésteres de esteroles) se puede formular fácilmente en los alimentos y por lo tanto pueden ser útiles en los alimentos funcionales. El uso de estos derivados de esteroides solubles en grasa ha permitido un aumento significativo en la eficacia de estos compuestos, en comparación con los planteamientos iniciales de la administración de FT en forma de cristal, lo cual requiere cantidades relativamente grandes para lograr un efecto significativo [25, 37].

Se necesitan entre 10-20 gramos por día de FT cristalinos para lograr una reducción de colesterol sérico de aproximadamente un 10%, efecto que se logra con 2-3 g diarios de ésteres de esterol [99]. Por lo tanto, actualmente la incorporación de ésteres de esterol en la fracción grasa de los alimentos es la principal fórmula elegida [99-101], aunque también se están aplicando a otros alimentos de bajo contenido grasa.

Sin embargo, hay evidencias que demuestren que si los FT libres se administran en una forma que permita una entrega eficiente dentro de las micelas en el intestino delgado, estos serán más eficaces inhibiendo la absorción de colesterol que sus equivalentes esterificados [99, 102-104].

Además de en forma de esteres de esterol [105], se han desarrollado muchas otras formulaciones eficaces para incorporar FT libres en alimentos, nutracéuticos y productos farmacéuticos [98, 99]. Estas formulaciones incluyen emulsiones ricas en FT [20, 64, 99, 106, 107], triglicéridos recristalizados con FT no esterificados [108] y la formación de micropartículas de FT [109]. Este último también se puede combinar con la incorporación de estas micropartículas en una emulsión [98]. Otros métodos incluyen la disolución homogénea, basada en mezclar FT fundidos con aceites o grasas [104], la formulación de liposomas [110] y formulaciones que combinan policosanoles y ésteres de fitosterol con ácido ascórbico [111].

2.1.6. Alimentos enriquecidos con esteroides vegetales

La eficacia de los FT en la reducción del colesterol se ha probado, predominantemente, mediante su incorporación a cualquiera de las grasas para untar [112]. Tanto esteroides como estanoles vegetales se han integrado en leche desnatada y yogur, productos de panadería, zumo de naranja, barras de cereal, bebidas bajas en grasa, chocolate, etc. El impacto de la composición en FT de los distintos alimentos sobre el efecto hipocolesterolémico aún no ha sido completamente aclarado debido a la gran variabilidad de los datos de los ensayos clínicos realizados con el mismo tipo de alimento. Abumweis y col. [82] clasificaron 59 estudios en cuatro grupos de acuerdo con el contenido en grasa y las propiedades físicas de diferentes alimentos utilizados para la administración de FT: grasas para untar, mayonesa y salsas para ensaladas, leche y yogur y otros (incluido el chocolate, barras de cereales, bebidas, zumos, carnes y

productos para horno). La incorporación en los grupos mayonesa/salsas para ensaladas y leche/yogur se asoció con una mayor eficacia en la reducción del colesterol LDL en comparación con la incorporación a otros alimentos, lo que indica el importante papel de la matriz del alimento en el efecto reductor de colesterol. En particular, se ha demostrado que los ésteres de estanol vegetales con leche desnatada son casi tres veces más eficaces que con pan y cereales para el desayuno [113].

2.1.7. Otros efectos biológicos de los esteroides vegetales

Además de las acciones sobre el metabolismo lipídico y lipoproteico, los esteroides vegetales afectan a otros procesos metabólicos. En los últimos 15 años han surgido numerosos estudios que han asociado el consumo de estos compuestos con otras propiedades biológicas beneficiosas, tales como actividad anti-inflamatoria, antipirética, efectos sobre el cáncer, sobre las propiedades de membrana y sobre el sistema inmunitario. La mayoría de estos estudios son preliminares y se precisa de estudios controlados para confirmar estas propiedades.

Efectos sobre el cáncer

En los últimos años existe un gran interés por el posible papel de los esteroides vegetales en el cáncer, ya que estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que podrían ofrecer una protección frente a los tipos más comunes de las sociedades occidentales, como el de colon, mama y próstata [51, 114, 115]. Este efecto protector se basaría en una serie de mecanismos que incluyen efectos sobre la estructura y función de la membrana en las células tumorales y del huésped, vías de transducción de señales que regulan el crecimiento del tumor y apoptosis, función inmunitaria del huésped, y metabolismo del colesterol en el huésped [114]. Por ejemplo, se ha observado *in vivo* en roedores que los FT tienen una acción protectora frente a agentes cancerígenos químicos, retrasando la formación de tumores en el colon [116], e *in vitro* pueden inhibir el crecimiento de células humanas cancerígenas [117], así como de colonocitos transformados de roedores [118, 119]. Pero también hay datos diferentes, como un estudio prospectivo de cohortes en humanos que no indicó relación alguna entre la ingesta de esteroides vegetales y un menor riesgo de padecer cáncer de colon [51, 120].

Por otra parte, la hiperplasia prostática (que es benigna y no conduce a cáncer de próstata) se trata clínicamente en Europa con productos que contienen sitosterol [121], ya que, aunque no se observa ninguna reducción relevante en el volumen prostático, existen algunas evidencias experimentales que muestran una mejora sintomática (como un aumento en el flujo urinario y un menor volumen urinario residual) en pacientes tratados [121-123]. Estos resultados son destacables, ya que la cantidad de sitosterol que se suministra como suplemento en estos estudios es muy baja (unos 60 mg/día) respecto a la ingesta diaria normal de sitosterol en las dietas occidentales (unos 160-200 mg) [51].

Efectos sobre las propiedades de membrana

El hecho de que los esteroides vegetales sean incorporados a las membranas celulares [124, 125] hace pensar que puedan afectar a sus propiedades. Aunque hay datos que no indican ningún efecto del sitosterol sobre la fluidez de la membrana de queratocitos humanos [126], se ha demostrado un efecto deletéreo en las membranas de los glóbulos rojos de ratas hipertensas debido a un incremento en la incorporación de FT [125]. Este hecho se asoció a una menor esperanza de vida en estos animales, probablemente porque los esteroides reemplazaron al colesterol en las membranas de los eritrocitos, con lo cual serían menos deformables y más frágiles [125]. Es difícil predecir hasta qué punto los resultados de los FT sobre la deformación de los glóbulos rojos de rata puede extrapolarse a los humanos [51].

Efectos sobre el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria

Los efectos de los esteroides vegetales sobre la función inmunitaria no se han estudiado con detalle, pero algunas evidencias en humanos sugieren que podrían tener un efecto positivo sobre la respuesta inflamatoria y sobre el estado inmunológico en general [127].

2.1.8. Seguridad y eficacia de los esteroides vegetales

Estudios toxicológicos

El primer preparado comercial de FT para reducir el colesterol fue presentado por la compañía Eli Lilly (Indianápolis, IN) en la década de 1950. El preparado contenía inicialmente cerca de un 65% de sitosterol, pero más tarde los preparados contenían hasta un 90% de sitosterol [128]. En esa misma década, Shirley y col. llevaron a cabo un estudio de seguridad muy completo sobre los esteroides de soja y el b-sitosterol [129]. Durante dos años, ratas, conejos y perros fueron alimentados con cantidades relativamente grandes de FT. Las ratas fueron alimentadas con un 5% de FT, los conejos con un 4%, y los perros recibieron de 0,5 a 1,0 g / kg / día. Estos autores no detectaron efectos significativos sobre el crecimiento, las proteínas del suero, el nitrógeno ureico en sangre, o el aspecto microscópico de cualquier órgano o tejido.

Desde 1999 Hepburn y col. [130] están llevando a cabo una evaluación continua de la seguridad de los ésteres de fitoesterol y sus formas oxidadas. Hasta la fecha no han encontrado evidencia de toxicidad o de genotoxicidad. En este primer estudio, las ratas (n = 20 por grupo, machos y hembras) fueron alimentados con mezclas de ésteres de fitoesterol a niveles de 0,1, 1,0, 2,0, y 5,0 (peso / peso) durante 90 días. Los principales componentes de la dieta de FT fueron b-sitosterol (48,7%), campesterol (25,8%), y estigmasterol (26,7%). Se midieron veintiún parámetros clínicos sanguíneos y se compararon los pesos de una serie de tejidos. Los resultados fueron la ausencia de cambios relacionados con el tratamiento [131-138]. Un estudio sobre la reproducción no encontró efectos adversos de los ésteres de fitoesterol administrados por vía oral en 2 generaciones sucesivas de ratas Wistar [138]. No se observaron indicios de efectos estrogénicos, ni hubo cambios en los niveles de hormonas reproductivas en mujeres voluntarias. Los ésteres de fitoesterol de la dieta tampoco tuvieron efectos sobre las enzimas bacterianas fecales o los ácidos grasos de cadena corta en las heces de voluntarios humanos [136].

Cabe destacar que los resultados de los estudios toxicológicos con ésteres de fitoestanol reflejan lo mismo que se observa con ésteres de fitoesterol. Los ésteres de fitoestanol no mostraron actividad genotóxica en los ensayos de mutación génica in vitro utilizando células de mamíferos o bacterias [139, 140], ni ejercieron efectos

adversos sobre la reproducción y el desarrollo en ratas hembra [141, 142]. Todas las pruebas toxicológicas de rutina dieron resultados negativos en ratas, tanto para fitoesteroles como fitostanoles, lo cual confirmó los resultados de un estudio anterior de Malini y Vanithakumari [143].

Ingesta máxima

Según la información clínica detallada de un estudio de de Jong y col. en humanos [144] la ingesta diaria de FT debería limitarse a menos de 8,6 g/día. Sin embargo, como los consumidores cada vez están más expuestos a una gran variedad de productos alimenticios enriquecidos con FT la probabilidad de efectos adversos puede aumentar un poco y se hace necesaria una vigilancia a medio-largo plazo [144, 145]. Aun así, como se ha expuesto anteriormente, los FT han sido considerados seguros y eficaces para ser utilizados como ingredientes funcionales para reducir las concentraciones de colesterol en la sangre.

Biodisponibilidad de carotenoides y vitaminas liposolubles ante un consumo excesivo de esteroides vegetales en la dieta

Los carotenoides (α/β -caroteno, licopeno, zeaxantina, luteína, etc.) son pigmentos orgánicos presentes en plantas y otros organismos fotosintéticos. Pertenecen a la familia de los terpenos y presentan actividad antioxidante y pro-vitamina A. Al ser solubles en grasa forman parte de las micelas mixtas durante la digestión y circulan por el torrente sanguíneo asociados a las LDL. Como los FT reducen la solubilidad del colesterol al desplazarlo de las micelas mixtas, otros compuestos liposolubles (como estos nutrientes antioxidantes liposolubles) también pueden ser desplazados. Varios estudios han demostrado que los FT disminuyen las concentraciones en sangre de β -caroteno en un 25%, de α -caroteno en un 10%, y de la vitamina E en un 8% [85, 100, 146-148]. En los estudios, los cambios en las concentraciones en sangre de estos antioxidantes se deben ajustar a la concentración total de colesterol LDL (ya que estos antioxidantes forman parte de estas lipoproteínas, protegiéndolas de la oxidación), teniendo en cuenta la reducción del colesterol LDL debida a los FT. Al realizar este ajuste, las concentraciones de vitamina E se mantuvieron sin cambios, pero las de β -caroteno se redujeron entre un 8% y un 19% [149]. Por el contrario, en otro estudio de Hallikainen y Uusitupa [150] al ajustar los niveles totales de colesterol y de beta

caroteno observaron que los cambios no eran significativos y los niveles de carotenoides eran similares a los de los controles. Otros autores [85, 88, 90, 151, 152] tampoco han observado que los fitoesteroles y fitoestanoles de margarinas enriquecidas tuvieran ningún efecto sobre los carotenoides y vitaminas liposolubles (vitamina D, vitamina A y la vitamina K) del plasma. Cabe destacar, que el consumo de alimentos ricos en carotenos, como las frutas y verduras, pueden contrarrestar este efecto secundario [149, 153].

Por último, un trabajo de Katan y col. [154] resume los datos de varios estudios y concluye que las reducciones en los niveles de α -tocoferol y β -caroteno observadas en el plasma están en el orden del 10% al 25%, lo que en su opinión está dentro de la interindividualidad y/o las variaciones estacionales. Además, al no haber datos sobre cuales son los niveles óptimos de carotenoides en el plasma, el efecto negativo de esta reducción es, si cabe, más relativo.

El mecanismo que subyace a estos efectos no se conoce completamente, aunque los FT pueden reducir la incorporación de estos compuestos en las micelas mixtas [155].

2.2. TOCOFEROLES

2.2.1. Definición, tipos y fuentes

Los tocoferoles (o vitamina E) son micronutrientes esenciales liposolubles presentes en los aceites vegetales en cuatro formas (isómeros α , β , γ y δ). Los cuatro isómeros de los tocoferoles (Figura 11) y sus respectivos isómeros de tocotrienoles (presentan tres dobles enlaces) (α , β , γ , δ) (Figura 12) son reconocidos por su eficiente efecto inhibitorio de los procesos de oxidación de lípidos en alimentos y en sistemas biológicos [156]. El α -tocoferol ha sido el más estudiado, demostrando tener una mayor biodisponibilidad y actividad antioxidante en humanos que el resto de isómeros [157].

Los tocoferoles se encuentran en semillas oleaginosas, hojas y otras partes verdes de plantas. El alfa-tocoferol se encuentra principalmente en los cloroplastos de las células vegetales, mientras que sus homólogos beta-, gamma- y delta- se encuentran

fuera de estos orgánulos. Por su parte, los tocotrienoles se encuentran en la corteza y en el germen de algunas semillas y cereales. En general, se pueden encontrar niveles altos de vitamina E en los siguientes alimentos [158]: espárragos, aguacate, huevo, leche, frutos de cáscara (como almendras o avellanas), semillas, espinacas y otras hortalizas de hoja verde (2 mg - 13% CDR), aceites vegetales sin calentar, germen de trigo y alimentos integrales .

Se obtienen industrialmente como un subproducto del refinado de aceites de germen de trigo, arroz, maíz o soja o por síntesis química [159]. Puesto que la vitamina E y sus homólogos, los tocoferoles y los tocotrienoles, son sintetizados solo en plantas, estos compuestos constituyen micronutrientes esenciales muy importantes en la dieta del hombre, recomendándose una ingestión diaria de 15 mg al día [160].

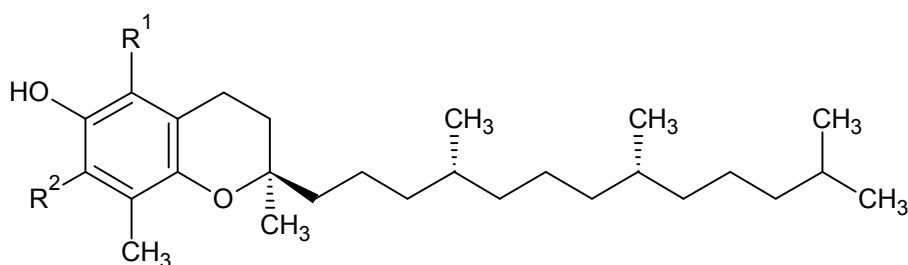


Figura 11. Tocoferoles

α -tocoferol: R1 = CH3 R2 = CH3; β -tocoferol: R1 = CH3 R2 = H;
 γ -tocoferol: R1 = H R2 = CH3; δ -tocoferol: R1= H R2= H

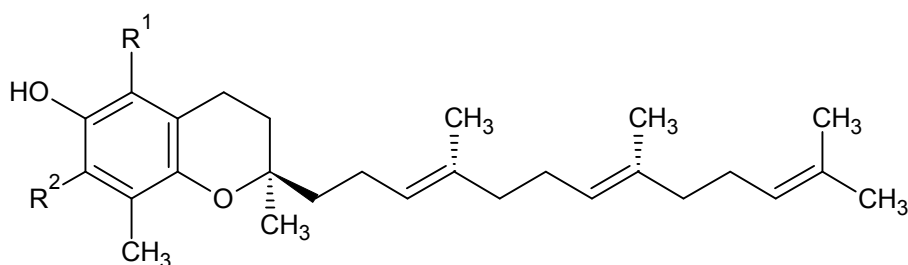


Figura 12. Tocotrienoles.

α -tocotrienol: R1 = CH3 R2 = CH3; β -tocotrienol: R1 = CH3 R2 = H;
 γ -tocotrienol: R1 = H R2 = CH3; δ -tocotrienol: R1= H R2= H

2.2.2. Propiedades beneficiosas y efectos sobre la salud

La actividad antioxidante de los tocoferoles y de los tocotrienoles es debido principalmente a su habilidad para donar sus hidrógenos fenólicos a los radicales libres, deteniendo, por ejemplo, la producción de especies reactivas de oxígeno en la oxidación lipídica. El orden de esta actividad autooxidativa relativa de los tocoferoles es el siguiente: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ [161]. El antioxidante primario natural por excelencia es el α -tocoferol, cuyo sitio activo es el hidrógeno situado en la posición 6 (OH), el cual debe estar libre, no esterificado, para poder ejercer su función antioxidante. Su eficacia en membranas y en las LDL disminuye a medida que el radical se encuentra más hacia el interior de éstas, ya que, pese a ser liposoluble, el hidrógeno activo del α -tocoferol debe quedar situado en la interfase lípido-agua [162]. Hasta el momento se desconoce si los diferentes homólogos pueden actuar frente a la oxidación por otras vías a parte de la neutralización radicalaria [163]. Sin embargo, ciertos estudios *in vitro* han encontrado un efecto prooxidante del tocoferol, efecto que no tendría lugar *in vivo* gracias a su regeneración por el ubiquinol-10 o el ácido ascórbico [162].

Por otro lado, estudios recientes sugieren que la función principal de la vitamina E es actuar como molécula de señalización y que su papel en el metabolismo antioxidante es poco significativo [164, 165].

Diversos estudios confirman los beneficios para la salud que puede suponer la incorporación de tocoferoles en la dieta, por ejemplo, en la prevención de enfermedades cardiovasculares [166, 167] y de cáncer [168]. Por otro lado, contribuyen de forma importante en la conservación de los propios alimentos y en la estabilidad de los aceites debido a su acción como defensa primaria de la peroxidación lipídica.

Además, se han hecho estudios que relacionan los tocoferoles como parte del tratamiento de la enfermedad de alzheimer [169] y otras enfermedades neurodegenerativas y vasculares [170]. Aunque son necesarios más estudios clínicos, los resultados recomiendan aumentar el consumo de frutas y verduras ricas en antioxidantes naturales en la dieta.

Los tocotrienoles han sido menos estudiados, pero parecen tener un efecto protector frente a la enfermedad cardiovascular [171] e inhibir el crecimiento de las células cancerosas en las glándulas mamarias [172], efecto que no exhiben los tocoferoles. Los resultados obtenidos de recientes investigaciones parecen indicar que las funciones biológicas de tocoferoles y tocotrienoles no parecen estar relacionadas entre si [173].

2.3. ÁCIDOS GRASOS BIOACTIVOS O FUNCIONALES

Dentro de los lípidos, hay ciertos ácidos grasos que por sus importantes funciones fisiológicas beneficiosas, tienen el potencial para ser utilizados como ingredientes funcionales, ya que su consumo ha demostrado tener una relación positiva con la salud [174-180]. Este apartado se centrará principalmente en los ácidos grasos funcionales presentes en la grasa láctea: ácido linoleico conjugado (CLA), ácido vaccénico y ácidos grasos de cadena corta y media (C:2-C:12), entre los que cabe destacar el ácido butírico.

Los ácidos grasos (AG) son compuestos orgánicos que poseen un grupo funcional carboxilo y una cadena hidrocarbonada larga (son ácidos alifáticos monocarboxílicos) que actúan como bloques de construcción de los lípidos. Se diferencian en la longitud de la cadena, pudiendo tener entre 4 y 36 átomos de carbono. La mayoría de los ácidos grasos naturales tienen un número par de átomos de carbono que oscila entre 12 y 24, siendo especialmente abundantes los de 16 y 18. Estos pueden ser saturados, que no poseen dobles enlaces, o monoinsaturados o poliinsaturados, dependiendo del número de dobles enlaces.

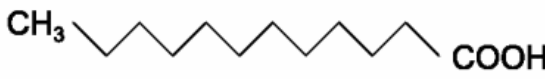

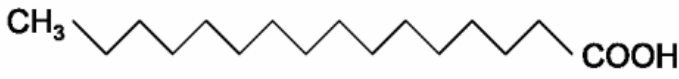

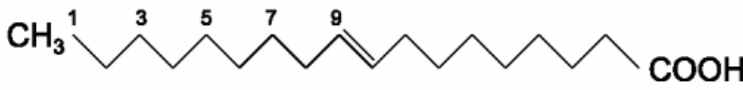
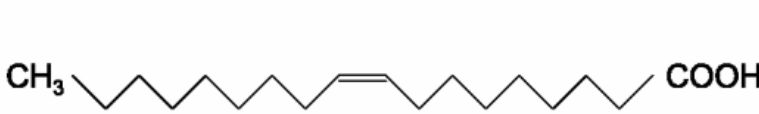
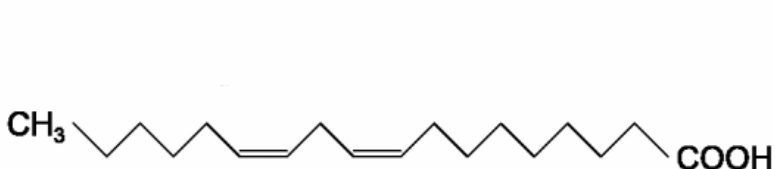
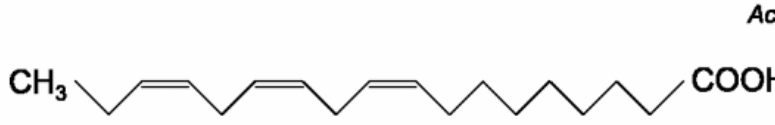
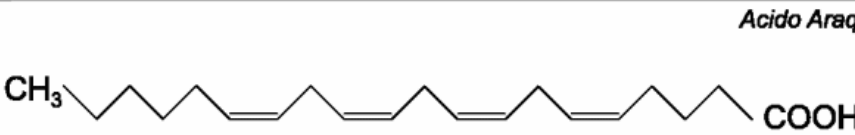

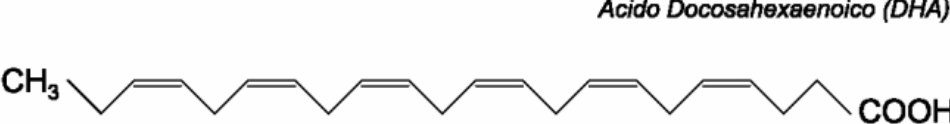
	Acido Láurico - 12:0
	Acido Mirístico - 14:0
	Acido Palmítico - 16:0
	Acido Estéarico - 18:0
	Acido Eláídico - trans 18:1 - ω 9
	Acido Oleico - cis 18:1 - ω 9
	Acido Linoleico - cis 18:2 - ω 6
	Acido α-Linolénico - cis 18:3 - ω 3
	Acido Araquidónico - cis 20:4 - ω 6
	Acido Eicosapentaenoico (EPA) - cis 20:5 - ω 3
	Acido Docosahexaenoico (DHA) - cis 22:6 - ω 3

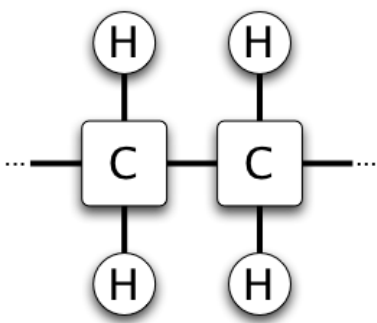
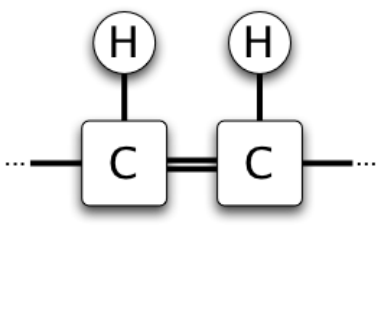
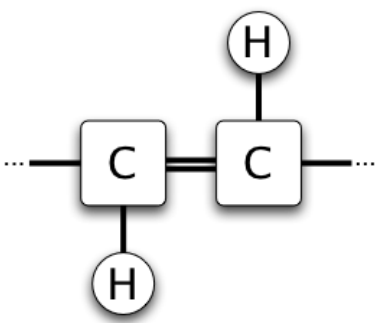
Figura 13. Estructura química de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) biológicamente más importantes en nutrición humana

Aunque existen varios sistemas de nomenclatura, los ácidos grasos se suelen expresar por sus nombres comunes clínicos o dietéticos, por ejemplo, "el ácido oleico". En la nomenclatura Δ -x (o delta-x), cada doble enlace se indica por Δ x donde el doble enlace está localizado en el x-ésimo enlace carbono-carbono contando desde el ácido carboxílico terminal. Cada doble enlace está precedido por el prefijo *cis*- o *trans*-, que indican la conformación de los sustituyentes en la molécula (Tabla 4) (Figura 14). La mayoría de los ácidos grasos insaturados que existen en la naturaleza presentan configuración *cis*.

En la nomenclatura n-x (también ω -x u omega-x) la posición que ocupan los dobles enlaces se indica con respecto al último carbono de la cadena (el extremo metilo CH_3 -), o sea, el carbono ω ; de ahí derivan las denominaciones de ω -3, ω -6, etc. Esta nomenclatura es un modo de abreviar la categorización de los ácidos grasos y sus propiedades fisiológicas.

Un ácido graso ω -3 será el que tenga su primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, y un ácido graso ω -6 tendrá el primer doble enlace entre los carbonos 6 y 7, siempre a contar desde el extremo CH_3 -. Por ejemplo, el α -linolénico se clasifica como n-3 u omega-3, por lo que comparte características con otros compuestos de este tipo (Figura 15).

Tabla 4. Diagrama de la estructura molecular de distintos ácidos grasos

Ácidos grasos saturados	Ácido graso <i>Cis</i> -insaturado	Ácido graso <i>Trans</i> -insaturado
		
Átomos de carbono saturados (cada uno con 2 hidrógenos) unidos por un solo enlace.	Átomos de carbono insaturados (cada uno con 1 hidrógeno) unidos por enlace doble. Configuración <i>cis</i>	Átomos de carbono insaturados (cada uno con 1 hidrógeno) unidos por enlace doble. Configuración <i>trans</i>

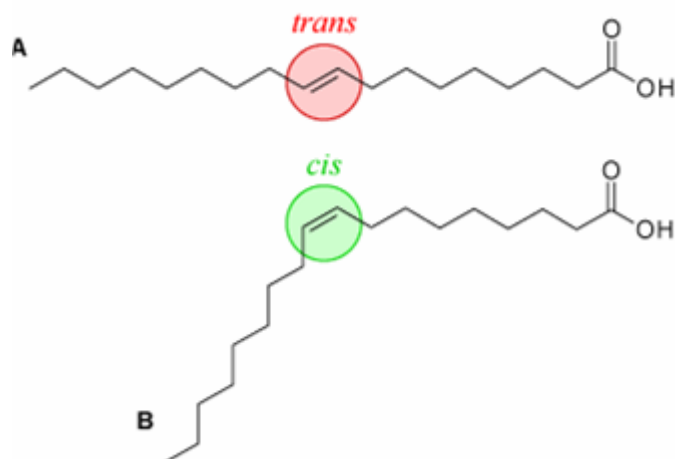


Figura 14. Ácido oleico trans (A) (llamado ácido elaídico) y cis (B).

Para el ácido linoleico, un ácido graso poliinsaturado de 18 átomos de carbono con dos dobles enlaces, la estructura exacta viene dada por el nombre sistemático *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico, y por la abreviatura 18:2 *cis*, *cis* Δ 9, Δ 12 [181].

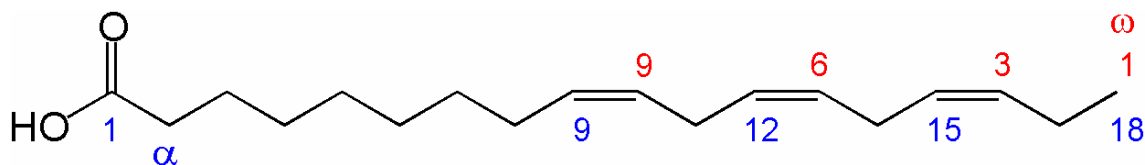


Figura 15. Ácido alfa linolénico o ácido *cis*-9,12,15-octadecatrienoico o C18:3 (ω -3)

2.3.1. Ácidos grasos omega 3, omega 6

Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) son ácidos grasos alifáticos con colas de 16 o más átomos de carbono [182]. Este grupo de ácidos grasos incluye los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs ó PUFA en inglés), que son los ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces. Existen dos familias principales de AGPIs - los ácidos grasos omega-3 y los omega-6. Dado que los humanos no pueden sintetizar los dobles enlaces en la posición 6 o menor, los AGPIs omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6) son ácidos grasos esenciales, necesarios para la salud humana y que deben ser obtenidos a partir de la dieta.

El compuesto padre³ de la familia omega-6, el ácido linoleico (LA) (C18:2, n-6) es abundante en la naturaleza y se encuentra en las semillas de la mayoría de las plantas, por lo que presenta un alto contenido en los aceites de uso común en la cocina, como el aceite de maíz y el de girasol [183]. El LA es cada vez más popular en cosmética por sus propiedades beneficiosas sobre la piel (propiedades anti-inflamatorias, de reducción del acné y de retención de la humedad) [184, 185]. El ácido linoleico ha demostrado reducir activamente el colesterol sanguíneo [186, 187].

El ácido alfa-linolénico (ALA) (C18:3, n-3), es el compuesto padre de la familia omega-3, es mucho menos común y se encuentra principalmente en la soja, el aceite de colza, linaza y nueces de nogal. Este ácido graso regula la producción de diferentes eicosanoides, reduce la presión arterial en individuos hipertensos, y disminuye los triacilglicérols y el colesterol en sangre [188]. Además, varios estudios sugieren que podría reducir la proliferación de ciertos tipos de cáncer [189, 190]. Se ha sugerido que el ALA en la dieta es esencial para un desarrollo neuronal óptimo durante los periodos de crecimiento fetal y postnatal [191].

Tanto el α -linolénico como el ácido linoleico pueden ser modificados enzimáticamente por elongasas y desaturasas para dar lugar a AGPIs: el ácido linoleico a ácido araquidónico (AA) (C20:4, n-6), y el α -linolénico en ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5, n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA) (C22:6, n-3).

El ácido γ -linolénico (C18:3, omega-6) tiene un importante papel en determinados procesos fisiológicos humanos. Se encuentra en la leche materna y en diversos vegetales y semillas. Se produce a partir del ácido linoleico por acción de la enzima $\Delta 6$ desaturasa, pero esta enzima suele tener poca actividad en el cuerpo humano por deficiencias nutricionales en vitaminas y minerales. Tiene efectos antiinflamatorios [192], actividad anticarcinogénica [193-198] y, debido a la inhibición de la síntesis de leucotrieno B₄, se ha usado en el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística [199, 200].

³ *Compuesto original de una familia química a partir del cual se pueden sintetizar el resto de compuestos de dicha familia.*

En 1976, investigadores daneses observaron que la incidencia y la mortalidad por cardiopatía isquémica era mucho menor en la población esquimal, que consumía una gran cantidad de grasas de origen marino (hasta 10-12 g/día), muy ricas en AGPIs omega-3, que en la de población danesa que habitaba en la isla, que consumía principalmente AGPIs omega-6 [201, 202]. De hecho, el cociente ácidos grasos poliinsaturados/saturados era de 0,84 en la población esquimal y de 0,24 en los daneses. Por tanto, estos investigadores relacionaron la baja incidencia de cardiopatía isquémica con la ingesta de AGPIs n-3 procedentes de los aceites de pescado.

Desde entonces, numerosos estudios experimentales, epidemiológicos y de intervención [203-208] han demostrado que la ingesta de una dieta rica en AGPIs n-3, tales como EPA y DHA, reduce la mortalidad coronaria y la muerte súbita cardíaca [209] y que, en las zonas geográficas donde los AGPIs n-3 predominan en la dieta, la incidencia de enfermedades cardiovasculares aterotrombóticas disminuye. En los últimos años se ha demostrado que los AGPIs n-3 de pescado presentan múltiples efectos protectores cardiovasculares, ya que reducen las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y presentan propiedades antiarrítmicas, antiinflamatorias, antiaterogénicas y antitrombóticas [209, 210]. Además de todos estos beneficios, unos niveles bajos de DHA se han relacionado con una reducción de los niveles de serotonina en el cerebro [211], lo cual se asocia con el déficit de atención e hiperactividad, la enfermedad de Alzheimer y la depresión, entre otras enfermedades, habiendo evidencias de que la suplementación con DHA puede ser eficaz en la lucha contra estas enfermedades [212, 213]. Por último, también hay numerosos estudios sobre las propiedades anticancerígenas de estos ácidos grasos [179, 214, 215].

El ácido araquidónico es otro ácido graso omega 6 con propiedades importantes. Se acumula rápidamente en el cerebro en desarrollo durante el último trimestre de la gestación [216]. Un déficit de AA se traduce en un crecimiento reducido en niños [217] y se ha visto que fórmulas infantiles suplementadas con AA a partir de aceite de hongos mejora el crecimiento de los niños prematuros [218]. La suplementación con ácido araquidónico también ha demostrado tener efectos beneficiosos en pacientes amnésicos humanos, mejorando la disfunción cognitiva debida a daños orgánicos cerebrales o a la edad [219]. El AA también participa en la supresión del crecimiento de las células tumorales de pulmón [220].

Para un correcto funcionamiento del organismo se tiene que establecer la relación adecuada entre los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6. Actualmente, en las dietas occidentales existe una proporción demasiado elevada en la ingestión de omega-6 que suele oscilar entre un 10:1 o 20:1, cuando la proporción adecuada se situaría en un 3:1, es decir, tres partes de omega-6 por una parte de omega-3. Esta enorme superioridad en la ingesta de omega-6 frente a la de omega-3 puede ser responsable de algunas enfermedades cardiovasculares, diabetes, ciertas depresiones, etc. La solución consiste en aumentar los alimentos que contengan más omega-3 o tomar suplementos de este componente y disminuir aquellos alimentos muy ricos en omega-6 [221].

2.3.2. Ácidos grasos omega 9

Los principales ácidos grasos omega-9 son el ácido oleico y el ácido palmitoleico, presentes en numerosos aceites vegetales, como el aceite de oliva o de girasol. Estos ácidos grasos han demostrado tener efectos beneficiosos, en cambio, otros omega-9 no tienen un efecto tan claro, o incluso algunos, como el ácido erúcico que se encuentra en el aceite de colza, pueden tener efectos perjudiciales para la salud humana.

Ácido oleico

El ácido oleico (C18:1) o ácido *cis*-9-octadecaenoico es un ácido graso omega-9 monoinsaturado que se encuentra en varias fuentes animales y vegetales. El ácido oleico es el principal componente del aceite de oliva constituyendo un 55-80% del total.

Numerosos estudios epidemiológicos demuestran que la sustitución en la dieta de grasas saturadas por grasas monoinsaturadas, como el ácido oleico, provocan una disminución en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [222], ya que estas dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados disminuyen la concentración de colesterol y triacilglicérols en sangre [223, 224].

Además, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en ácido oleico tienen una menor modificación oxidativa, lo que supone una disminución en el riesgo de aterosclerosis [225].

2.3.3. Ácidos grasos *trans*

Los ácidos grasos *trans* (AGT) son AG insaturados que tienen en su estructura al menos un doble enlace en configuración *trans*. En nutrición se suelen utilizar los términos ácidos grasos *trans*, grasas *trans*, ácidos grasos isoméricos o isómeros *trans* de los ácidos grasos para hacer alusión al componente lipídico de la dieta que contiene este tipo de ácido graso. En base a sus orígenes y a sus actividades biológicas, los ácidos grasos *trans* se pueden dividir en AGT conjugados (los dobles enlaces en configuración *trans* están situados en carbonos adyacentes) y no conjugados (los dobles enlaces en configuración *trans* están separados por un carbono metilo).

En la naturaleza la mayor parte de los ácidos grasos se encuentra en conformación *cis*, sin embargo, en algunos animales puede presentarse una pequeña porción de ellos en configuración *trans*; este es el caso de los rumiantes en los que se produce la transformación de una parte de los AG contenidos en el pasto a su forma *trans* por el efecto de la fermentación anaerobia (biohidrogenación) de las bacterias del rumen. Estos AG transformados son incorporados a la carne y la leche del ganado vacuno, ovino y caprino. Sin embargo, las cantidades más importantes de AGT aparecen en los procesos de hidrogenación parcial de los aceites vegetales comestibles para convertirlos en grasas con un punto de fusión más elevado, fundamentalmente margarinas y grasas de repostería. Estos ácidos grasos se conocen como ácidos grasos *trans* industriales (por ejemplo, el ácido elaídico). Los AGT representan aproximadamente el 5 % del total de los AG en productos vacunos y ovinos, mientras que en las grasas hidrogenadas industrialmente pueden representar más del 50 %. Otra fuente importante de AGT son los alimentos fritos con grasas recalentadas.

¿Qué efectos tienen los ácidos grasos *trans* para la salud?

Los ácidos grasos *trans* industriales son la principal fuente de AGT, y se consideran un problema de salud importante con respecto al riesgo de ECV [226, 227], ya que aumentan los niveles del colesterol total y LDL, reducen los niveles de HDL, afectan a la inflamación sistémica y a la disfunción endotelial [228-230].

Dos estudios recientes han encontrado asociaciones entre el consumo de ácidos grasos *trans* y los factores de riesgo de ECV [231, 232]. Motard-Belanger y col. (2008)

informaron que un consumo alto (3,7% de la energía) de AGT de rumiantes afecta negativamente a los niveles de colesterol LDL de forma similar a los ácidos grasos *trans* industriales, aunque cabe destacar que no hubo ningún efecto con el consumo moderado (1,5% de la energía). Mientras tanto, en el estudio de Chardigny y col. (2008) un consumo en torno al 5% del nivel de energía de AGT industriales sólo tuvo efectos adversos en las mujeres, pero no en los hombres, lo que indicaría una diferencia de género, además de afirmar que el efecto reductor de las HDL parece ser específico de los AGT industriales.

Los efectos de los AGT que hasta el momento se describen pueden ser explicados por varios hechos. Los AGT al tener una estructura mucho más lineal que los AG insaturados, casi comparable con la de los saturados, se empaquetan mucho mejor en las membranas biológicas que como lo hacen los AG insaturados, lo cual origina una mayor rigidez y menor permeabilidad y posiblemente interfieran con las funciones, señalizaciones e interacciones entre las diferentes proteínas de membrana. Por otro lado, los AGT inhiben competitivamente las enzimas elongasas y desaturasas alterando el metabolismo de los eicosanoides, y su consumo elevado puede exacerbar las manifestaciones derivadas de la deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados. Más recientemente se ha encontrado que los AGT pueden limitar la expresión de los genes de la lipasa lipoproteica y del receptor nuclear PPAR (receptor activado del proliferador de peroxisomas). El producto de ambos genes está involucrado profundamente en el metabolismo lipídico y de las lipoproteínas.

¿Son perjudiciales todos los ácidos grasos *trans*?

En los alimentos derivados de los rumiantes aparece un tipo de AGT denominado ácido linoleico conjugado (CLA, por sus siglas en inglés). Los CLA pertenecen a los ácidos grasos conjugados que se diferencian de los demás AGT en que los dobles enlaces en configuración *trans* están situados en carbonos adyacentes. Al contrario de lo que ocurre con los demás AGT, a los diferentes isómeros del CLA se les atribuyen numerosos efectos beneficiosos, los cuales se detallarán en el siguiente apartado.

¿Debemos eliminar todos los ácidos grasos *trans* de nuestra alimentación? ¿Cuánto podemos consumir?

Llevar a cero el consumo de AGT no es tan simple. De hecho existe un consenso internacional de que no es recomendable reducir a cero el consumo de AGT, debido a que ello podría resultar en una ingestión inadecuada de proteínas y micronutrientes importantes presentes en muchos de los alimentos que los contienen. Las actuales recomendaciones nutricionales fijan la ingestión de isómeros *trans* en menos del 1 % de la energía total, lo que equivale aproximadamente a 2g/día para una dieta de 2000 Kcal.

2.3.4. Ácido linoleico conjugado (CLA)

El CLA representa una mezcla de al menos 28 isómeros [233] posicionales y geométricos del ácido linoleico, un ácido graso de 18 carbonos con dos dobles enlaces. En general, las parejas de dobles enlaces en los ácidos grasos tienen un grupo metileno entre ellos, pero en el CLA esto no ocurre, estando conjugados (Figura 16).



Figura 16. Ácido linoleico conjugado c9, t11 (izquierda) y ácido linoleico (derecha)

Los isómeros del CLA difieren en las posiciones de los dobles enlaces, los cuales pueden estar en (9,11), (10,12), (8,10), (7,9) y (11,13); y en la configuración del doble enlace, que puede ser *cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis* o *trans-trans*. Esta mezcla de isómeros podría explicar la variedad de actividades biológicas del CLA.

Aunque varios de estos isómeros del CLA se encuentran en los alimentos [234], el foco principal de la investigación se ha centrado en los dos isómeros principales, *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12; siendo el CLA *cis*-9, *trans*-11 el mayoritario (> 80%) en alimentos como carne, leche y productos lácteos [235, 236] (Tabla 5). Este isómero se origina por biohidrogenación (conversión de enlaces insaturados en saturados) del ácido linoleico a ácido esteárico por las bacterias del rumen, concretamente por la bacteria

Butyrivibrio fibrisolvens [237]. Una fuente alternativa de CLA *cis*-9, *trans*-11 es la desaturación delta-9 del ácido *trans*-11 vaccénico, isómero principal de ácidos grasos *trans* de los rumiantes, y que está presente en los tejidos de estos mamíferos [238, 239]. El otro isómero principal del CLA sintético, el *trans*-10, *cis*-12, está presente en cantidades insignificantes en los alimentos. Dentro de los isómeros de menor importancia, el isómero de CLA *trans*-9, *trans*-11 inhibe la agregación plaquetaria [240, 241] y tiene un efecto antiproliferativo [241]. Actualmente la mayoría de las publicaciones sobre las actividades del CLA se refieren a los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12, por lo que los efectos que se citan a continuación se refieren a estos isómeros principales.

Tabla 5. Contenido de CLA (isómero *cis*-9, *trans*-11) en alimentos.

Muestra	CLA (<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11) mg/g de lípidos	CLA (<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11) mg/100 g de muestra (peso húmedo)
Leches		
Entera	4,5	14,2
Semidesnatada (2%)	4,1	8,0
Evaporada	3,4-6,4	22,2-43,5
Nata montada	4,2	129,4
Quesos		
Azul	4,9-7,9	147,5-228,5
Brie	4,75	129,4
Cheddar	4,3	151,0
Cougar gold	3,72	130,0
Edam	5,38	141,7
Mozzarella	4,31	91,4
Parmesano	4,00	89,9
Suizo	5,45	160,9
Crema o de untar	4,30	142,9
Productos lácteos fermentados		
Yogur	3,82	7,4
Crema agria	4,14	76,1
Crema de mantequilla	4,66	5,7
Cárnicos		
Cordero	12,0	216,0
Filete de ternera	6,5	40,3
Pechuga de pollo	1,5	5,1
Chuleta de cerdo	1,5	22,5
Conejo	1,4	7,8

Actividades biológicas del CLA

Actividad anticancerígena

El CLA ha demostrado reducir el cáncer de piel, estómago, colon, mama e hígado en varios modelos animales [242-244]. Se ha sugerido que el CLA no sólo reduce la iniciación, promoción y progresión de las etapas de desarrollo del cáncer, sino que también reduce la metástasis [242-244]. El CLA puede estar involucrado en la reducción de la producción de eicosanoides, interfiriendo con las vías de señalización celular, en la inhibición de la síntesis de ADN, mejorando la apoptosis, así como en la inhibición de la angiogénesis debido a la reducción de las metaloproteinasas de la matriz y de factores de crecimiento vascular endotelial [242-244].

Prevención de enfermedades cardiovasculares

El CLA ha demostrado reducir las lesiones ateroscleróticas en conejos y hámsteres [245-247]. En otra serie de modelos animales el CLA redujo los niveles de colesterol total, de triglicéridos (TG), de colesterol LDL y aumentó el colesterol HDL [242, 248, 249]. Parece ser que el CLA afecta a estos parámetros reduciendo la presión arterial, mediante la participación en la activación de los receptores de proliferación de peroxisomas (PPAR, clave para la lipogénesis), regulando las proteínas que se unen a los elementos reguladores de esteroides (SREBPs, claves para la síntesis y elongación de ácidos grasos) y/o regulando la esteroil-CoA desaturasa (SCD, clave para la formación de TG y colesterol) [242, 250-252] .

Reducción de grasa corporal

Uno de los aspectos del CLA que ha atraído mucho la atención es su capacidad para reducir la grasa corporal en los animales, lo cual fue constatado por primera vez por Park y col. [253]. Desde entonces, se ha confirmado que el CLA *trans*-10, *cis*-12 es el isómero responsable de esta actividad [254]. Parece ser que este efecto del CLA es el resultado de múltiples mecanismos: el aumento del gasto energético, la reducción de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo y/o la diferenciación de los adipocitos, el aumento de la apoptosis del adipocito, la modulación de adipocinas y citocinas, como la leptina, TNF-alfa, la adiponectina o las interleuquinas, y el aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético [254].

Respuesta inmune e inflamatoria

Numerosos estudios han demostrado que el CLA tiene propiedades anti-inflamatorias: reduciendo la inflamación del colon, disminuyendo la producción de citocinas inducidas por antígeno en células inmune competentes, y modulando la producción de citocinas, prostaglandinas y el leucotrieno B₄ [242, 255-259]. Sin embargo, Poirier y col. [260] comprobaron que el isómero *trans*-10, *cis*-12 es capaz de inducir respuestas inflamatorias en el tejido adiposo blanco.

El CLA también ha demostrado mejorar la respuesta inmune mediante la modulación del factor-alfa de necrosis tumoral (TNF- α), de las citocinas (es decir, la interleucina-1, 4, 6, u 8), las prostaglandinas, o los óxidos de nitrógeno, reduciendo la respuesta inmune de tipo alérgico [242, 261-265].

La salud del hueso y el CLA

Aunque algunos estudios afirman que el CLA mejora la masa ósea atendiendo a los datos de peso de cenizas, de densidad ósea, de contenido mineral del hueso, de peso de hueso en seco, de longitud del hueso, o del calcio, el magnesio o el contenido de fósforo, los efectos de CLA sobre la masa ósea no han sido consistentes [266-277]. Recientemente se ha publicado que esta inconsistencia en los resultados del efecto del CLA sobre la masa ósea puede ser debida en parte a la interacción entre el CLA y el calcio de la dieta [278]. También se ha descrito que el CLA produce una disminución de las actividades de los osteoclastos lo que reduce la resorción ósea, aunque otros estudios no observaron ningún efecto del CLA sobre los marcadores de resorción ósea [279-281].

Interacción entre isómeros del CLA

Se ha demostrado que los dos isómeros mayoritarios mencionados son igualmente eficaces en lo que respecta a la mayoría de las actividades contra el cáncer [282-284]. Al margen de los efectos contra el cáncer, el isómero *trans*-10, *cis*-12 es responsable de cambios en la composición corporal, la inhibición de la actividad esteroil-CoA desaturasa, proteínas y/o ARNm, y la reducción de la secreción de la apolipoproteína B en cultivos de células hepáticas humanas [274, 285, 286]. Por otro lado, el isómero *cis*-9, *trans*-11 es responsable de la promoción del crecimiento en los

roedores, la mejora de los perfiles de las lipoproteínas y es más eficaz en la inhibición del TNF-alfa que el isómero *trans*-10, *cis*-12 [262, 265, 287]. También hay casos en que los dos isómeros parecen tener efectos opuestos [288]. Por lo tanto, los numerosos efectos fisiológicos del CLA parecen ser el resultado de múltiples interacciones de estos dos isómeros biológicamente activos [254, 289].

Aspectos de seguridad

En lo referido a estudios en animales, las principales preocupaciones sobre el uso del CLA identificadas hasta ahora son la lipodistrofia, el hígado graso y la intolerancia a la glucosa [290-292]. La lipodistrofia y el hígado graso pueden ser el resultado de los efectos pronunciados del CLA en la movilización de la grasa del cuerpo, así como en el aumento de la síntesis de ácidos grasos en el hígado [290, 293, 294]. Parece ser que estos efectos son más pronunciados en los ratones que en las ratas, y podrían ser una respuesta temporal y reversible [295, 296].

Es bien sabido que una reducción de la grasa corporal puede mejorar la respuesta a la insulina, pero este efecto que cabría esperarse del CLA no se ha demostrado de forma consistente. El CLA aumentó la resistencia a la insulina en animales normales, pero también mejoró la resistencia a la insulina en un modelo de obesidad, lo cual puede sugerir que esto es temporal y que una alimentación con CLA puede mejorar la resistencia a la insulina después de un período de aumento de dicha resistencia [295, 297]. Este aumento de resistencia a la insulina por el CLA puede ser debido, en parte, a la mejora de la β -oxidación de los ácidos grasos, el período de experimentación, y/o estar relacionada con efectos del CLA sobre adipocinas y citocinas como el TNF- α [254, 265, 298-302]. El CLA, en particular el isómero *trans*-10, *cis*-12, también reduce la actividad y la expresión del transportador de glucosa 4, pero posteriormente se comprobó que el isómero *cis*-9, *trans*-11 producía un efecto mayor [289], el cual está mediado, en parte, por el factor nuclear κ B (NF κ B) y la proteína quinasa activada por mitógenos extracelulares [303]. Un informe de Poirier y col. [304] sugiere que el CLA puede aumentar la secreción de insulina del páncreas, debido a la hiperplasia de células B, aunque los resultados de este estudio precisan una mayor evaluación. En general, el mecanismo exacto por el cual el CLA modula el metabolismo de la glucosa no se

conoce, por lo que es necesario seguir evaluando el efecto del CLA en la homeostasis de la glucosa.

Estudios en seres humanos

En marzo de 2008 había 83 estudios en humanos sobre el CLA. Alrededor del 45% de estos estudios en seres humanos se centraron en la obesidad, seguido por las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus (metabolismo de la glucosa), las respuestas inmunes e inflamatorias, el metabolismo de los lípidos, el cáncer y el hueso.

La mayoría de los ensayos clínicos fueron estudios doble ciego controlados por placebo. En los primeros estudios el aceite de oliva fue la primera opción para los placebos, mientras que en estudios más recientes se ha utilizado aceite de girasol alto oleico. Otros placebos que se han usado han sido los aceites de semillas de girasol, la semilla de cártamo, soja, aceite de canola o de palma y aceite de soja. La mayoría de los estudios utilizan entre 3,5 y 4,5 g CLA / día, con un rango de 0.45-6.8 g CLA / día. En un estudio de 2007, Whigham y col. [305] observaron una correlación significativa entre la dosis de CLA utilizada y el efecto de los cambios en la masa grasa. La duración de estos estudios va desde 5 días hasta 2 años, aunque lo más normal fueron entre 9-12 semanas.

La reducción de grasa corporal en los estudios en humanos

Los estudios en humanos sobre los efectos del CLA en la grasa corporal se pueden resumir en las siguientes revisiones [242, 254, 305, 306], citadas ya anteriormente. En comparación con los estudios en ratones, el efecto del CLA en la reducción de grasa fue menos eficaz en los seres humanos [242, 254, 307, 308]. Estas diferencias en los seres humanos pueden ser debidas: a las dosis relativamente bajas que se utilizan en los estudios en seres humanos en comparación con las utilizadas en los ratones, a la diferencia de metabolismo entre especies, o la diferencia en el protocolo experimental, tales como el cálculo de la grasa pre-existente respecto a la acumulación de grasa [254, 301, 309-312]. Más importante aún son los estudios en humanos con

distintos regímenes de la dieta, los estudios *ad libitum*⁴ en modelos animales (sobre todo en fase de crecimiento, donde se da un balance positivo de energía) y los ensayos en humanos de la respuesta frente a la restricción calórica (balance energético negativo). De hecho, cuando los ratones recibieron CLA durante la restricción dietética (balance energético negativo), no se observaron beneficios adicionales del CLA en el peso y la grasa corporal [301, 311]. Del mismo modo, ninguno de los estudios con un plan de dieta hipocalórica (con una restricción de más de 200 calorías por día) encontró efectos positivos relacionados con el CLA en los marcadores de grasa corporales, independientemente de la dosis o la duración de los efectos [313-315]. Esto sugiere que el CLA puede ser eficaz en la reducción de la ganancia de masa grasa durante el período de aumento de peso (un balance energético positivo) [314, 316, 317]. A la vista de los resultados, parece ser que los estudios con una duración de menos de 4 semanas pueden no ser adecuados para observar este efecto de CLA, mientras que cuando las duraciones son más largas (> 6 meses), el CLA muestra una mayor eficacia [315].

Las enfermedades cardiovasculares

Numerosos estudios en humanos han analizado los efectos del CLA sobre los marcadores sanguíneos de las enfermedades cardiovasculares: colesterol total, HDL, LDL, TG, AGL, la presión arterial y la frecuencia cardíaca. En general, la mayoría de los documentos (> 80%) no reportaron cambios en el colesterol, las LDL, TG, o AGL, aunque alrededor del 30% de las publicaciones reportaron una reducción de las HDL en relación con el CLA, lo que pueden tener un impacto negativo sobre la salud. Por otro lado, en 4 de las 11 publicaciones analizadas se informa que el CLA disminuye la presión arterial (2 la presión arterial sistólica y 2 la diastólica), lo que puede ser beneficioso al disminuir uno de los factores de riesgo de las ECV [318-321]. Herrera y col. [320, 322] realizaron dos estudios para ver el efecto del CLA sobre la hipertensión inducida por el embarazo (preclampsia). En estos estudios, la suplementación con calcio y CLA disminuyó la hipertensión inducida por el embarazo, aumentó el peso de los recién nacidos y mejoró la función endotelial, sin afectar a los parámetros de la presión

⁴ *Ad libitum* se usa en psicología y en biología para referirse al peso de un animal cuando todavía no se ha impuesto ningún control sobre su alimentación. Un ejemplo de este uso podría ser: "El peso *ad libitum* de la rata fue de 320 gramos". En estudios nutricionales, la frase denota el libre acceso de un animal a agua o alimento cuando dejamos que sean las necesidades biológicas de éste las que regulen el consumo. Por ejemplo: "Se les proporcionó a las ratas acceso *ad libitum* a alimentos y agua."

arterial. Además de estos efectos sobre la presión arterial, se ha observado un aumento de la frecuencia cardíaca relacionada con el CLA, pero sin cambios en la agregación plaquetaria [315, 321, 323].

Cáncer

En comparación con el gran número de evidencias de efectos anticancerígenos del CLA en estudios con animales, el número de estudios en humanos es bastante reducido. Knekt y col. [324] realizaron el primer estudio de CLA y cáncer, donde se observó una relación inversa entre la ingesta de leche (prueba indirecta) y la incidencia de cáncer de mama. En este estudio, el CLA se propuso como uno de los componentes activos potenciales en la leche. Desde entonces, se han publicado otros estudios que examinan el efecto del CLA sobre el cáncer de mama. Aro y col. [325] observaron un efecto preventivo con alimentos ricos en CLA en las mujeres posmenopáusicas, mientras que otros estudios no encontraron correlación entre CLA y el riesgo de cáncer de mama, según lo observado por los niveles de CLA en el suero, el pecho o en los tejidos adiposos [325-329]. Además del cáncer de mama, Larsson y col. [330] observaron una correlación inversa entre CLA y la incidencia de cáncer colorrectal en un estudio en mujeres que duró 15 años.

CLA y las respuestas inmunes e inflamatorias

El CLA puede influir positivamente en las funciones inmunes e inflamatorias. Se ha demostrado que aumenta la producción de anticuerpos (IgA e IgM), provoca la disminución de TNF- α e IFN-g, y la disminución de la activación de células T inducidas por mitógenos, aunque se han encontrado resultados inconsistentes para la hipersensibilidad de tipo retardado [331-334]. Cabe destacar, por su interés, un estudio de Turpeinen y col. [334] donde observaron que la suplementación con CLA puede aliviar algunas de las respuestas alérgicas en individuos con alergia al polen de abedul.

La salud del hueso

Según dos estudios en humanos el CLA tiene un efecto beneficioso sobre la masa ósea [335, 336]. Sin embargo, otros estudios no observaron diferencias por la suplementación de CLA en los marcadores séricos para la salud ósea o la densidad

mineral ósea [337-339]. También es interesante destacar que en el trabajo de Brownbill y col. [335] se estudió a mujeres posmenopáusicas que consumen suplementos de calcio, y que el isómero de CLA más importante relacionado con este estudio fue el *cis*-9, *trans*-11 isómero y no el *trans*-10, *cis*-12. Por otra parte, otros autores han informado que el CLA mejora la absorción de calcio *in vivo* y en la línea celular Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano, lo que sugiere que el CLA puede aumentar el efecto del calcio en la masa ósea, lo cual es coherente con los resultados de estudios en animales [278, 279, 340-343]. Aunque, a la vista de los resultados de estos trabajos, parecen ser necesarios estudios de una mayor duración para dilucidar el efecto de los dos isómeros CLA en la salud ósea, mediante su interacción con el calcio.

Preocupaciones de seguridad en los seres humanos. Estudios de toxicidad

La seguridad de los preparados comerciales de CLA también ha sido evaluada en numerosos ensayos clínicos en humanos. La mayoría de preparados comerciales de CLA destinados al consumo humano están compuestos por un 90% de los dos isómeros biológicamente activos, el *cis*-9, *trans*-11 y el *trans*-10, *cis*-12, en cantidades iguales aproximadamente [344]. No hay evidencias que indiquen que estos preparados de CLA, cuando se consume en dosis de 3-6,8 g / día, induzcan efectos adversos en humanos sanos [336]. Los resultados recientes de estudios de toxicidad de larga duración, 4 en humanos [314, 315, 336, 338] y 2 estudios con ratas [296, 345], con una duración de entre 12 y 24 meses, no encontraron efectos adversos significativos (en órganos, parámetros sanguíneos, comportamiento y otros datos físicos) en la suplementación con CLA.

Un estudio estadounidense estimó el consumo promedio de CLA en humanos entre 0,3 y 1,2 g / persona / día [346]. Suponiendo un estándar de 60 kg de peso corporal como media, la ingesta de CLA sería de entre 5 y 20 mg / kg de peso corporal / día. En comparación, la media de la dosis en el estudio con ratas durante 36 semanas [345] fue 100 veces mayor que la media estimada en humanos (500-2000 mg / kg de peso corporal / día), indicando una ausencia de toxicidad. Esta, y otras evidencias, sirvieron para apoyar la actual determinación potencial de estado GRAS del CLA.

Analizando los resultados de los distintos estudios sobre los numerosos efectos beneficiosos del CLA en humanos, se puede estimar una ingesta diaria recomendada de entre 2,5 y 3,5 g / persona / día, teniendo en cuenta, por ejemplo, que en el caso de la pérdida de peso, el isómero responsable es el *trans*-10, *cis*-12, por lo que, dependiendo de la composición del suplemento, la ingesta para alcanzar este beneficio podría necesitar ser algo superior.

2.3.5. Ácido vaccénico

El ácido *trans*-11 vaccénico [AV, 5 *trans*-11 18:1 (n-9)] es el monoeno *trans* predominante en grasas de rumiantes (\approx 1,7% del total de ácidos grasos, en un rango de entre 0,4 y 4%) y se produce naturalmente durante la biohidrogenación parcial de ácido linoleico (LA) [18:2 (n -6)] y el ácido linolénico (ALA) [18:3 (n-3)] [347, 348]. El AV actúa como un precursor para la síntesis endógena del ácido linoleico conjugado *cis*-9, *trans*-11 en seres humanos y animales a través de la acción de la enzima Δ^9 desaturasa [348, 349] (Figura 17). La tasa de la conversión del AV para dar CLA ha sido estimada entre un 5 y 12% en los roedores y entre un 19 y 30% en los seres humanos [349]. Curiosamente, mientras que la industria láctea se ha esforzado por aumentar el contenido de CLA en los alimentos para aprovechar sus propiedades beneficiosas, informes recientes han demostrado que estos procesos de producción también aumentan el AV, hasta 10 veces más que el CLA [350].

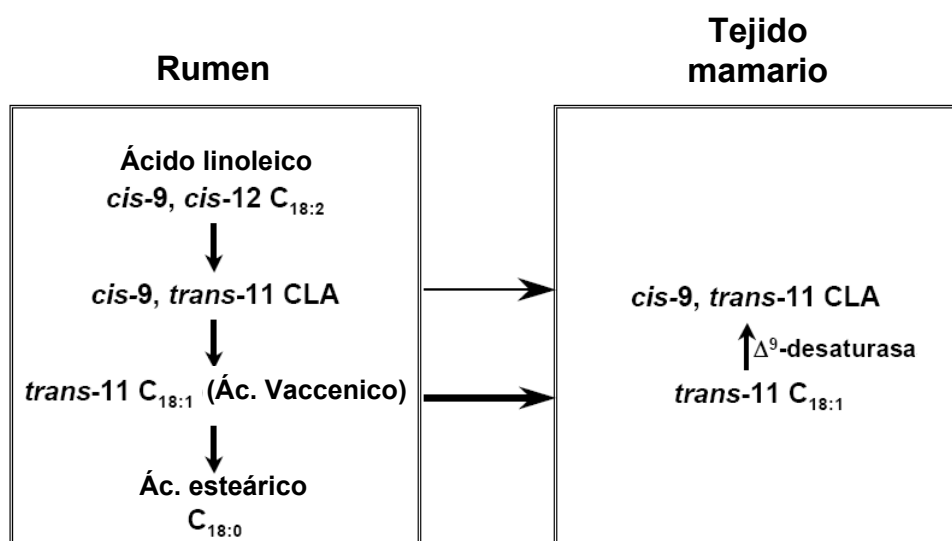


Figura 17. Papel de la biohidrogenación en el rumen y la Δ^9 -desaturasa tisular en la producción del CLA *cis*-9, *trans*-11 en la grasa láctea. Adaptado de Bauman y col. [351].

Actualmente se sabe muy poco acerca de la potencial bioactividad del AV sobre los lípidos de la sangre o la respuesta inflamatoria. Quizás los principales factores que han limitado la caracterización de las posibles acciones metabólicas del AV han sido su disponibilidad y/o su coste purificado. Sin embargo, es interesante destacar que hay algunas pruebas que apoyan la hipótesis de que el AV por sí solo no es perjudicial para la salud [352-356].

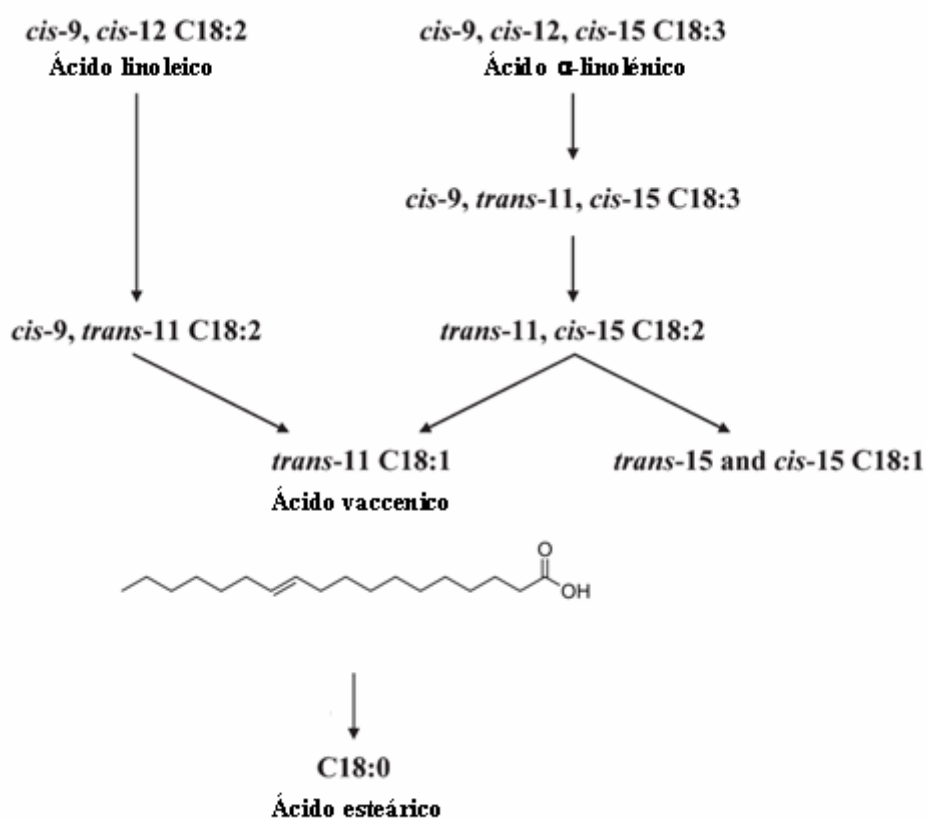


Figura 18. Rutas bioquímicas clásicas para la biohidrogenación del ácido linoleico y linolénico en el rumen. Adaptado de [347].

Meijer y col. [355] compararon dietas que contenían un 10% de la energía procedente del AV y del ácido elaídico y no encontraron ningún efecto beneficioso del AV sobre los lípidos sanguíneos en hámsters. En cambio, otros estudios en animales y humanos han indicado que la alimentación con productos lácteos enriquecidos con AV, aparte de tener efectos neutrales sobre la salud, puede mejorar el perfil de los lípidos plasmáticos relacionados con la reducción del riesgo de ateroma. Lock y col. [356] demostraron que una mayor ingesta de AV (15% del total de grasa) produce un menor

riesgo de aterosclerosis mediante la mejora de perfil de lipoproteínas plasmáticas en hámsters. Además, Tholstrup y col. [352] demostraron que la alimentación con una mantequilla con un mayor contenido de AV reducía significativamente el colesterol total en hombres sanos. Recientemente, 2 grupos de investigación independientes parecen indicar que un consumo moderado de ácidos grasos *trans* de fuentes naturales tiene efectos neutrales y efectos beneficiosos sobre varios factores de riesgo de ECV en humanos [231, 232]. Cabe destacar que los datos de estos importantes estudios clínicos puede que sean limitados para evaluar los efectos beneficiosos del AV debido a que usan mezclas con otros ácidos grasos bioactivos como ciertos ácidos grasos saturados, CLA y el ácido oleico. Por último, dos estudio con ratas JCR [357, 358] que presentaban el síndrome metabólico (prediabetes, obesidad, hiperlipidemia y alteración de la regulación inflamatoria) observaron que el AV reducía significativamente los niveles de triglicéridos y de colesterol total y LDL plasmáticos en condiciones de dislipemia, pero el resto de parámetros (resistencia a la insulina, estado inflamatorio, etc.) no se vieron afectados.

Lo que parece claro es que resulta difícil evaluar los efectos beneficiosos del AV como tal, ya que, siempre habría que tener en cuenta su tasa de transformación al isómero más bioactivo del CLA (*cis-9, trans-11*). Aunque, el mero hecho de ser precursor de un isómero que ha demostrado tener numerosos efectos beneficiosos para la salud, ya resultaría en una propiedad beneficiosa.

2.3.6. Ácidos grasos de cadena media

Los triglicéridos de cadena media (TGCM) contienen ácidos grasos saturados con una longitud de 6 a 12 carbonos, como son el ácido caproico (C6:0), el ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0) y ácido láurico (C12:0) (Tabla 6), si bien el ácido láurico presenta propiedades intermedias entre los AGCM y los ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Se encuentran en algunos aceites como el de coco o el de palmiste, cuyo contenido en ácidos grasos de cadena media (AGCM) supera el 50% del total de ácidos grasos, y en una pequeña proporción en otros productos naturales como la leche bovina en la que C6:0-C10:0 constituyen del 4 al 12% del total de ácidos grasos [359], existiendo grandes diferencias entre especies, así la leche de cabra puede contener un 50% más AGCM que la de vaca [360].

Tabla 6. Principales ácidos grasos de cadena corta y media

Nombre común	Nombre sistemático	Fórmula química	AG	
Ácido acético	Ácido etanoico	CH ₃ COOH	C:2	CADENA CORTA
Ácido propionico	Ácido propanoico	CH ₃ CH ₂ COOH	C3:0	
Ácido butírico	Ácido butanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	C4:0	
Ácido caproico	Ácido hexanoico	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	C6:0	CADENA MEDIA
Ácido caprílico	Ácido octanoico	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	C8:0	
Ácido cáprico	Ácido decanoico	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	C10:0	
Ácido láurico	Ácido dodecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	C12:0	

Los AGCM tienen propiedades fisicoquímicas y metabólicas muy diferentes a los ácidos grasos de cadena larga (AGCL), como se presentará más adelante, y se consideran grasas no convencionales [361]. Desde 1994, los productos alimenticios que los contienen han merecido por la Agencia de Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA, USA) la denominación de sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS) [362, 363].

Absorción intestinal de los AGCM

La absorción de los AGCM es más rápida y más eficiente que la de los AGCL. Se sabe que los AGCM estimulan menos la secreción de colecistoquinina, fosfolípidos biliares y colesterol que los AGCL. En situaciones de deficiencia de lipasa pancreática o de sales biliares, los AGCM pueden absorberse, al contrario de lo que sucede con los AGCL [364].

Los TGCM que contienen ácidos caprílico (C8:0) y ácidos cáprico (C10:0), son hidrolizados por las lipasas gástrica, lingual e intestinal y rápidamente absorbidos. La

masa molar es lo suficientemente pequeña para que sean hidrosolubles por lo que se requieren menos sales biliares para su digestión, no se reesterifican en el enterocito, y son transportados por la vena porta [365]. Pueden ingresar en las células de la mucosa intestinal en forma de diglicéridos y monoglicéridos, los cuales son hidrolizados por la lipasa de la mucosa a AGCM y glicerol, los AGCM libres son unidos a albúmina y transportados vía porta al hígado (Figura 19). En virtud de que la velocidad de flujo sanguíneo portal es casi 250 veces mayor que el flujo de la linfa, los AGCM son absorbidos con rapidez y es probable que no sean afectados por factores intestinales que inhiban la absorción grasa.

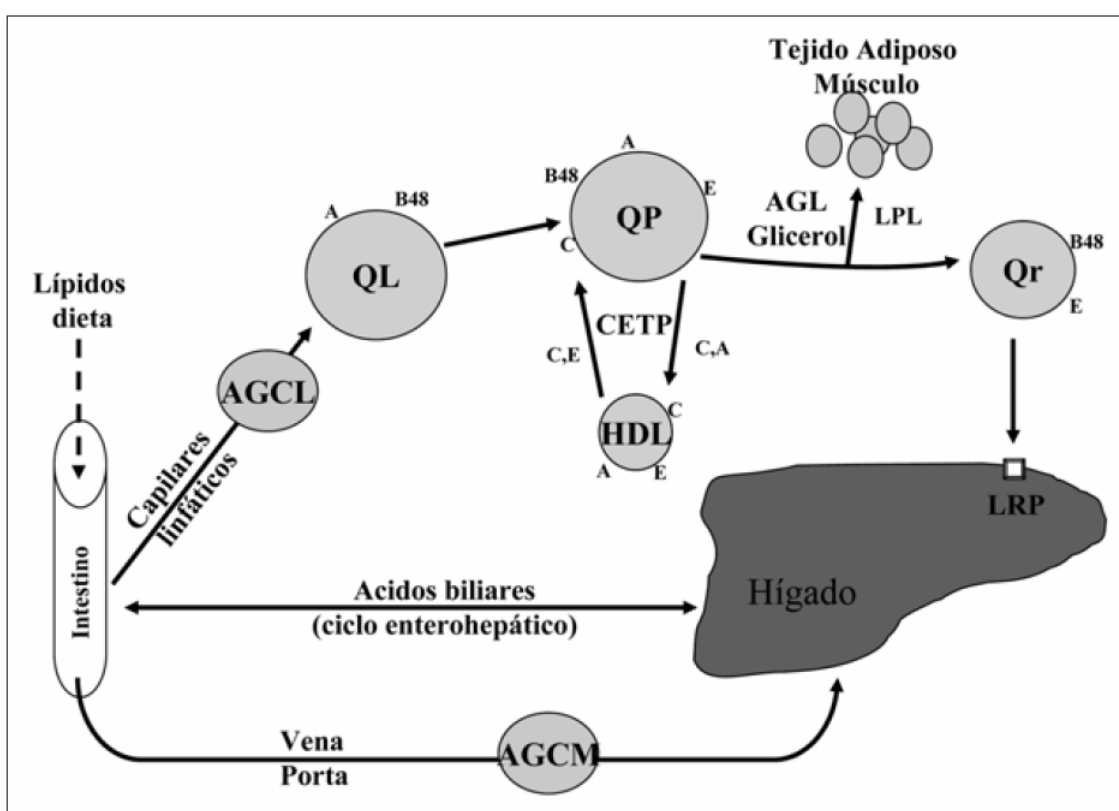


Figura 19. A, C, E, B48: apolipoproteínas; AGCL: Ácidos grasos de cadena larga; AGCM: Ácidos grasos de cadena media; AGL: Ácidos grasos libres; CETP: transferidor de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LPL: Lipoproteína lipasa; LRP: Receptor de quilomicron; QL: Quilomicron linfático; QP: Quilomicron plasmático; QR: Quilomicron remanente. [366]

Los AGCM no utilizados con fines energéticos por el propio enterocito son absorbidos y transportados por la vena porta al hígado, en lugar de ser incorporados a los triglicéridos de los quilomicrones y alcanzar la circulación sanguínea vía sistema linfático como sucede con los AGCL (Figura 19). No obstante, la proporción de los AGCM en los quilomicrones puede incrementarse mediante su consumo de forma

crónica. Además, la administración simultánea de TGCM y TGCL incrementa la aparición de AGCM en los quilomicrones [367].

Incorporación de los AGCM en hígado y tejido adiposo

Después de su absorción y transporte al hígado, los AGCM son sometidos preferentemente a β -oxidación, la cual tiene lugar preferentemente en las mitocondrias hepáticas, dado que el transporte intramitocondrial de los AGCM no requiere carnitil-acil transferasa [368], por lo que niveles bajos de esta transferasa no son limitantes en su metabolismo, mientras que en los peroxisomas los AGCM prácticamente no se oxidan. Consecuentemente, los AGCM son oxidados en mayor cuantía que los AGCL [369], y una buena parte del acetil-CoA producido durante la oxidación de los AGCM se dirige hacia la formación de cuerpos cetónicos.

A diferencia de los AGCL, los AGCM se incorporan en una pequeña proporción a los TG y fosfolípidos del hígado. El almacenamiento es ligeramente más elevado con el ácido cáprico (C10:0) que con el caprílico (C8:0) [370] e incluso parece que la captación de los AGCM por el tejido hepático tiende a disminuir cuando el régimen se mantiene [371].

En el adipocito blanco, los AGCM están virtualmente ausentes y son únicamente detectables después de la suplementación dietética [372], siendo menos eficiente la incorporación del ácido caprílico (C8:0) que la del ácido cáprico (C10:0). Se ha encontrado que después de un tratamiento durante tres meses con una dieta rica en AGCM, únicamente el 9% del total de estos ácidos grasos se habían incorporado en diferentes zonas del tejido adiposo. En el adipocito marrón los AGCM parecen inducir un incremento del efecto termogénico cuando estos provienen de los alimentos [371]. Se ha propuesto que el consumo de AGCM produce incremento de la oxidación lipídica y producción de calor, resultando en un balance energético negativo, lo cual promueve la oxidación lipídica y control del peso corporal aunque la ingesta energética permanezca a un nivel constante [373, 374].

Efectos en la salud

Efecto de los ácidos grasos de cadena media en la absorción de calcio

Entre los componentes dietéticos que afectan la absorción de calcio, además de la vitamina D, destacan la lactosa, los fitatos, los oxalatos y la grasa [375]. Respecto a este último punto, una cierta cantidad de grasa es necesaria para la absorción de calcio, pero una dieta con alto contenido en grasa decrecerá la biodisponibilidad del calcio dietético en casos de mala absorción de grasa. Esto se debe a que el calcio se une a los ácidos grasos saturados para formar jabones insolubles los cuales no se absorben y aparecen en heces. Sin embargo, los complejos AGCM-calcio y AGCC parecen incrementar la absorción del mineral [376, 377]. Se sabe que la grasa láctea y el ácido oleico favorecen la absorción de calcio mientras que los ácidos de cadena larga saturados favorecen la formación de jabones insolubles [378].

Griessen y cols. [379], al adicionar AGCM a una fórmula de proteína-hidratos de carbono, señalaron que tanto la absorción de calcio como los parámetros cinéticos no fueron diferentes respecto a los encontrados al adicionar AGCL. Campos y col. [380] compararon en ratas los efectos de la leche de cabra, rica en AGCM, frente a la leche de vaca sobre la absorción de calcio y su contenido en diferentes tejidos, y encontraron en el caso de la leche de los cápridos, un incremento en la absorción y contenido en hueso de calcio. Los resultados se atribuyeron a que los AGCM más abundantes en la leche de cabra, podrían incrementar el transporte pasivo de calcio en el intestino al favorecerse la formación de micelas y el flujo mucosa-serosa. Pero además, en la leche entera de cabra, la fracción proteica rica en lisina, y el contenido de vitamina D, podrían jugar también un papel positivo en la utilización del calcio.

Efectos de los AGCM en el metabolismo lipoproteico

Efectos de los AGCM en la lipemia postprandial

El efecto inhibitorio de los AGCM en la síntesis de apo B y secreción intestinal de triglicéridos puede afectar la respuesta postprandial de estos últimos. Los niveles de los triglicéridos del plasma se incrementan después de una comida que contiene grasa

para regresar a niveles basales después de 6-12 h [381]. El grado de respuesta postprandial de una comida rica en grasa está positivamente correlacionado con el riesgo de enfermedad cardiovascular y las causas del síndrome metabólico [382]. La respuesta postprandial es más pronunciada con los ácidos grasos saturados que con los insaturados, y con AGCM suele ser generalmente menor que la correspondiente a AGCL tanto en animales de experimentación [383] como en el hombre [384, 385].

Los sujetos obesos se benefician más de los efectos atenuantes de los AGCM que los no obesos, ya que la reducción de la respuesta postprandial del colesterol es mayor en ellos [386]. La carga lipídica fue pequeña en ese estudio, ya que solamente se utilizaron 10 g de aceite de soja o TGCM puros mezclados en una comida. El efecto diferencial tuvo lugar principalmente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y particularmente en la fracción aterogénica remanente de las LDL (LDL pequeñas y densas). La respuesta postprandial de la grasa de leche comparada con la de un aceite rico en AGPI fue igual o ligeramente menor en numerosos estudios [387]. Esta respuesta atenuada es debida probablemente a los AGCC y AGCM de la grasa láctea.

Efectos sobre el colesterol y triglicéridos plasmáticos

Debido a que los AGCM se absorben directamente por la circulación portal, no contribuyen a la formación de quilomicrones (Figura 19), por lo que se prescriben en pacientes que presentan hiperquilomicremia debido a deficiencias de la lipoproteinlipasa (LPL) o de la apolipoproteína CII7. No obstante, estudios a largo plazo han señalado que hasta un 10% de los AGCM se pueden incorporar a los quilomicrones cuando su consumo es crónico. Además es interesante resaltar que los AGCM guardan una gran especificidad de posición en los triglicéridos, así en los quilomicrones conservan la posición que tenían en la grasa de la dieta [388].

Los resultados son controvertidos en cuanto al efecto que produce el consumo de AGCM sobre la concentración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). Así, en la década de los sesenta se demostró que además de no incrementar el colesterol plasmático, disminuían los niveles de colesterol LDL, reducían la síntesis hepática del colesterol y ejercían poco efecto sobre el catabolismo de las LDL

mediado por los receptores Apo B/E [389]. Posteriormente, estudios realizados en la última década del pasado siglo mostraron que niveles similares de AGCM y AGCL ejercen poco efecto sobre las LDL, aunque incrementan la concentración de triglicéridos y disminuyen los niveles de colesterol HDL [390, 391]. Por ello, pudiera afirmarse que la ingesta de dietas ricas en AGCM presenta una respuesta metabólica similar a la de dietas pobres en grasa y ricas en hidratos de carbono [392]. No obstante, vale la pena resaltar que estos estudios fueron realizados con dietas ciertamente ricas en AGCM, pero que también contenían otros ácidos grasos como el palmítico o el mirístico que incrementan los niveles de colesterol LDL y colesterol HDL [393]. Además los ácidos grasos caprílico y cáprico en algunos estudios fueron comparados con dietas ricas en grasas saturadas y dietas ricas en ácido oleico. Con las dietas ricas en AGCM se obtuvieron valores de colesterol total y LDL más bajos que con las dietas ricas en grasas saturadas, pero valores de colesterol más altos respecto a las dietas ricas en ácido oleico [394, 395].

En ratas, se ha observado que el consumo de leche de cabra (rica en AGCM) frente a la de vaca incrementa la secreción biliar de colesterol y disminuye la colesterolemia y la trigliceridemia sin afectar la concentración de ácidos biliares, fosfolípidos biliares e índice litogénico⁵ [360]. Este efecto se ha relacionado con una menor absorción y menor síntesis endógena de colesterol inducida por los AGCM más abundantes en la leche de cabra frente a la de vaca, a lo que puede sumarse el pequeño aporte de ácido oleico de la leche de cabra, que como se sabe es hipocolesterolemizante. Es más, en ese estudio los autores encontraron que los efectos de la leche de cabra entera sobre el metabolismo lipídico eran similares a los del aceite de oliva virgen.

Sin embargo, en otros estudios se ha observado que dietas ricas en AGCM inducen hipertrigliceridemia como respuesta a la actividad reducida de la LPL en tejidos periféricos y por alteración del reparto en los tejidos de los triglicéridos sintetizados por vía de *novo* [396]. Aunque, nuevamente, los datos arrojados por diversas investigaciones posteriores muestran resultados controvertidos [395, 397].

⁵ Mide la tendencia a la formación de cálculos biliares, más concretamente la saturación del colesterol en la vesícula biliar.

Estudios recientes señalan que los ácidos octanoico [398, 399], decanoico y dodecanoico [398] estimulan en cultivos de hepatocitos la síntesis de apolipoproteína (apo) B, triglicéridos y secreciones de colesterol en menor cuantía que el ácido palmítico (C16:0). Según Sato y col. [398] los AGCM atenúan la estimulación del ácido palmítico en la secreción de la apo B. En ratones alimentados con dietas enriquecidas en ácido octanoico respecto a otras con ácido oleico (C18:1, n-9) o ácido linoleico (C18:2, n-6) la secreción de apo B y de triglicéridos hepáticos y la concentración plasmática de colesterol fueron menores [400].

Sin embargo, algunos estudios en humanos encontraron que los TGCM, respecto a los TGCL incrementaban el colesterol plasmático así como la concentración de triglicéridos. Los ácidos grasos que formaban parte de los TGCL eran monoinsaturados y poliinsaturados y procedían de aceites de soja, maíz y oliva [401, 402], y como es sabido son hipocolesterolemiantes comparados con los ácidos grasos saturados de cadena larga [403]. Cuando una dieta rica en TGCM fue comparada con otra rica en ácido láurico (C12:0), manteniendo idénticas las cantidades de ácidos grasos mono y poliinsaturados, el total de colesterol LDL se incrementó menos en la dieta rica en TGCM, debido a incrementos significativos en la actividad de los receptores para LDL [404]. Todos estos experimentos se realizaron con cantidades muy elevadas de TGCM en la dieta.

Otro estudio escoge un enfoque diferente y emplea menores cantidades de TGCM: se incluyeron 10 g TGCM o de TGCL no específicos de aceites en una dieta hipocalórica durante cuatro semanas [405]. Ambas dietas disminuyeron los niveles de colesterol total y de triglicéridos aunque los efectos fueron más notorios con los TGCM.

Implicación en la glucemia y resistencia a la insulina

La secreción de insulina en páncreas perfundido es menor en respuesta a AGCM que a AGCL [406]. Por otro lado, la oxidación de AGCL es menor cuando la dieta es rica en hidratos de carbono. Sin embargo, una carga de glucosa disminuye la oxidación del ácido oleico pero no la del ácido octanoico. Esto implica interacción entre el

metabolismo de la glucosa y el tipo de grasa en virtud de mecanismos relacionados con la entrada de AGCL en la mitocondria, pero no la de AGCM [407].

No obstante, *in vivo* la situación real del consumo de AGCM no ha mostrado un efecto claro sobre los niveles plasmáticos de insulina y glucosa. Así, en algunos estudios se ha observado que el consumo de AGCM provoca hipoglucemia, probablemente debido a una respuesta hiperinsulinémica atribuida a los efectos estimulantes de los AGCM ingeridos sobre las células beta de los islotes de Langerhans [408] o a la formación hepática de cuerpos cetónicos [409]; mientras que en otro estudio posterior se observó que la glucosa en ayunas y los lípidos séricos se incrementaban en comparación con una dieta rica en aceite de girasol alto oleico [402]. Sin embargo, parece que el consumo de cantidades moderadas de AGCM es capaz de disminuir la glucemia e insulinemia en sujetos obesos [405] y que la glucemia postprandial es menor en diabéticos que han tomado AGCM [410]. En estudios de tipo agudo y crónico se observa que la sensibilidad a la insulina se incrementa con AGCM [367, 411], por lo que los alimentos ricos en este tipo de grasas serían recomendables frente a los que contienen más AGS de cadena larga.

Efectos sobre el control de peso corporal

Los AGCM pueden intervenir en el control del peso corporal a través de tres mecanismos principales: estimular la β -oxidación, disminuir la lipogénesis en tejido adiposo y favorecer la formación de cuerpos cetónicos.

Una ingesta de 45-100 g de AGCM produce un incremento en la concentración de cuerpos cetónicos de 700 mmol/L, es decir de dos a cuatro veces mayor que la que inducen los AGCL [409]. En mujeres obesas se ha encontrado un paralelismo entre el incremento de cuerpos cetónicos inducido por una dieta de AGCM y el incremento de la saciedad. Jambor de Sousa y col. [412] demostraron recientemente que infusiones de ácido caprílico en el hígado de ratas disminuyeron la ingesta de alimentos, por lo que han sugerido que se debe al incremento en la oxidación lipídica. Sin embargo, la aplicabilidad de estos ácidos grasos en la disminución del apetito y por tanto en el control del peso corporal sigue siendo un tema de debate.

En animales alimentados con TGCM se constata que la ingesta de alimento, ganancia de peso y acúmulo de grasa se reducen en comparación con los que reciben dietas isoenergéticas que contienen TGCL [360, 374]. Se cree que la pérdida de peso es secundaria a la oxidación hepática de los AGCM, la cual incrementa el gasto energético. Así, cuando se comparan en roedores dietas isoenergéticas que contienen TGCL y TGCM, se observa que los TGCM incrementan la termogénesis [409, 413]. Sin embargo, estos resultados son difícilmente extrapolables a humanos ya que el consumo de dietas con altas cantidades de TGCM no es pauta frecuente, entre otros aspectos por no abundar en los alimentos, presentar baja palatabilidad y producir algunos síntomas gastrointestinales adversos. En términos generales los estudios señalan que debe aportarse al menos 30 g/día para obtener resultados sobre el peso corporal.

No obstante, los efectos sobre el peso corporal a largo plazo, en humanos, utilizando estos ácidos grasos son controvertidos, debido a que trabajos posteriores mostraron que la ingesta de dietas ricas en AGCM y AGCL no modificaba la pérdida de peso al final del estudio [371, 401, 410]. Vale la pena señalar que en numerosas ocasiones no se controlaron diversos parámetros, como el tipo de AGCM que se proporcionaban en las dietas, los cuales sí parecen importantes ya que, como se ha mencionado anteriormente, las dietas con mayor proporción de ácido caprílico ejercen efectos más marcados sobre la lipólisis [412, 414].

Se han seguido desarrollando dietas donde se ha logrado controlar el tipo y cantidad de AGCM principalmente ácido caprílico y decanoico (72%), y donde además se añade un porcentaje de AGPI n-3 del (22%), en forma de DHA (22:6, n-3) y EPA (20:5, n-3) sin la adición de otros AGCL. Con estas dietas se han observado resultados satisfactorios después de 15 días, tales como la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos y pérdida de peso [415]. Sin embargo, convendría investigar si los efectos se mantienen en el tiempo.

2.3.7. Ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son ácidos orgánicos (hidrocarburos monocarboxílicos) que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, es decir, el ácido acético (con 2 átomos de carbono), el ácido propiónico (C3) y el ácido butírico (C4) (Tabla 6).

Los AGCC se producen, principalmente, por la fermentación por parte de la flora bacteriana intestinal de los azúcares no digeridos y la fibra dietética [416], a lo largo de todo el intestino grueso, con un gradiente decreciente entre el ciego y el recto [417]. Las variaciones individuales en la composición de la flora bacteriana pueden afectar a este proceso de fermentación, durante el cual la fibra y polímeros de almidón son inicialmente hidrolizados a monómeros como la glucosa, lactosa, xilosa y arabinosa [418]. Estos sustratos luego se metabolizan por la glucólisis a piruvato, produciéndose también etanol, metanol, ácido fórmico, ácido láctico y succinato [419]. Estos productos, a su vez son posteriormente metabolizados, produciendo ácidos grasos de cadena corta y gas.

El ácido acético representa alrededor del 60% de los AGCC producidos en el colon, el ácido propiónico constituye el 25% y el ácido butírico el 15% [420]. Los AGCC son absorbidos rápidamente por la luz del colon, tanto activa (transportador monocarboxilato) como pasivamente (co-transportador Na-AGCC e intercambio aniónico), y de forma proporcional a la longitud de la cadena carboxílica [421]. Después de la absorción, los AGCC se metabolizan en las células epiteliales del colon, hígado y los tejidos principales, y contribuyen en el metabolismo energético.

Una vez absorbidos, los AGCC se oxidan rápidamente en las células epiteliales del colon, constituyendo la principal fuente de energía de estas células. El butirato se metaboliza casi completamente en estas células (70-90%), mientras que el ácido propiónico y acético lo son sólo débilmente [422].

Los AGCC han demostrado tener otros efectos beneficiosos, incluyendo la estimulación de la secreción mucosa, el aumento en el flujo vascular, la motilidad y la absorción de sodio, propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas [423]. Por el contrario, la disminución o ausencia de AGCC en el lumen puede tener efectos nocivos, como en las condiciones de colitis por desviación (enfermedad que produce la inflamación de la mucosa colorrectal por falta de AGCC) [424].

Ácido butírico

Aunque el ácido butírico representa sólo una pequeña parte de todos los AGCC, se considera el ácido graso más importante para las células epiteliales del colon, por su papel como sustrato de energía y por las numerosas acciones que ejerce sobre las células epiteliales y en la mucosa del colon.

El ácido butírico se metaboliza rápidamente en las mitocondrias de las células epiteliales a dióxido de carbono (CO₂) y acetil-CoA, una sustancia clave en el metabolismo oxidativo [425].

Además de sus funciones esenciales en el abastecimiento energético y la regulación metabólica de los colonocitos, el ácido butírico también ejerce otra serie de efectos beneficiosos:

- Efectos **antiinflamatorios** en el colon [426-428], los cuales son atribuidos a varios mecanismos que actúan a nivel de la mucosa. El butirato aumenta la mucina y la producción de proteínas [429, 430], reduce la secreción de mediadores pro-inflamatorios como el TNF- α , de IFN- γ e IL-12 [431, 432], inhibe la adhesión de los leucocitos al endotelio [433], aumenta la liberación de IL-10 [434] y reduce la producción de IL-8 inducida por lipopolisacáridos bacterianos [435] y la expresión del receptor intestinal de TLR4, que se considera un factor importante en la inmunidad natural y cuya expresión es elevada cuando hay enfermedades inflamatorias crónicas intestinales [436].
- Efectos **anticancerígenos**. Este ácido graso es capaz de inhibir la síntesis de ADN y el crecimiento celular en líneas celulares tumorales de colon [437-440] e inducir la diferenciación y la apoptosis por fragmentación del ADN [437, 441, 442]. A nivel molecular, el ácido butírico regula la expresión génica mediante la inhibición de la histona deacetilasa [443], modulando varias proteínas implicadas en el control del ciclo celular, la diferenciación y apoptosis, inactiva la expresión de oncogenes y regula la respuesta al estrés celular [439, 444, 445]. Una de estas proteínas parece ser la enzima glutatión S-transferasa, implicada en la

detoxificación de compuestos genotóxicos relacionados con el cáncer de colon [446, 447].

A pesar de los estudios epidemiológicos *in vitro* que demuestran los efectos beneficiosos de butirato sobre el cáncer de colon, en estudios *in vivo*, generalmente, no se ha logrado proporcionar resultados concluyentes [437, 448, 449]. Los autores especulan que esto puede ser debido a la corta vida media y al rápido metabolismo del butirato como fuente de energía para los colonocitos, que impiden el mantenimiento de concentraciones eficaces en la mucosa del colon para conferir beneficios anticancerígenos. Para superar estos problemas, se ha propuesto conjugar el butirato con otras moléculas, como por ejemplo:

- Carnitina. La conjugación de butiril-coenzima A con carnitina para formar butiril-carnitina mejora la vida media *in vivo* del butirato ingerido, aumentando sus efectos anticancerígenos [450].
 - Formando ésteres de aciloxialquilo, para formar pro-drogas estables y más activas [451] que han demostrado tener propiedades terapéuticas frente al cáncer de próstata [452].
 - Formando ésteres de esterol. Ugazio y col. [453] demostraron que una microemulsión de colesteril butirato era eficaz a la hora de transportar el butirato a las células cancerígenas, exhibiendo mayor efecto antiproliferativo que el butirato de sodio.
- Además, el ácido butírico es un importante **regulador de la reproducción de colonocitos** [439, 454].
- Por último, también está involucrado en la **regulación de la absorción de agua y electrolitos** [455].

3. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

3.1. Propiedades físico- químicas de los fluidos supercríticos

Una sustancia se encuentra en estado de fluido supercrítico cuando su temperatura y presión son superiores a su temperatura y presión crítica respectivamente. Esta región se muestra en el diagrama de fases de la Figura 20.

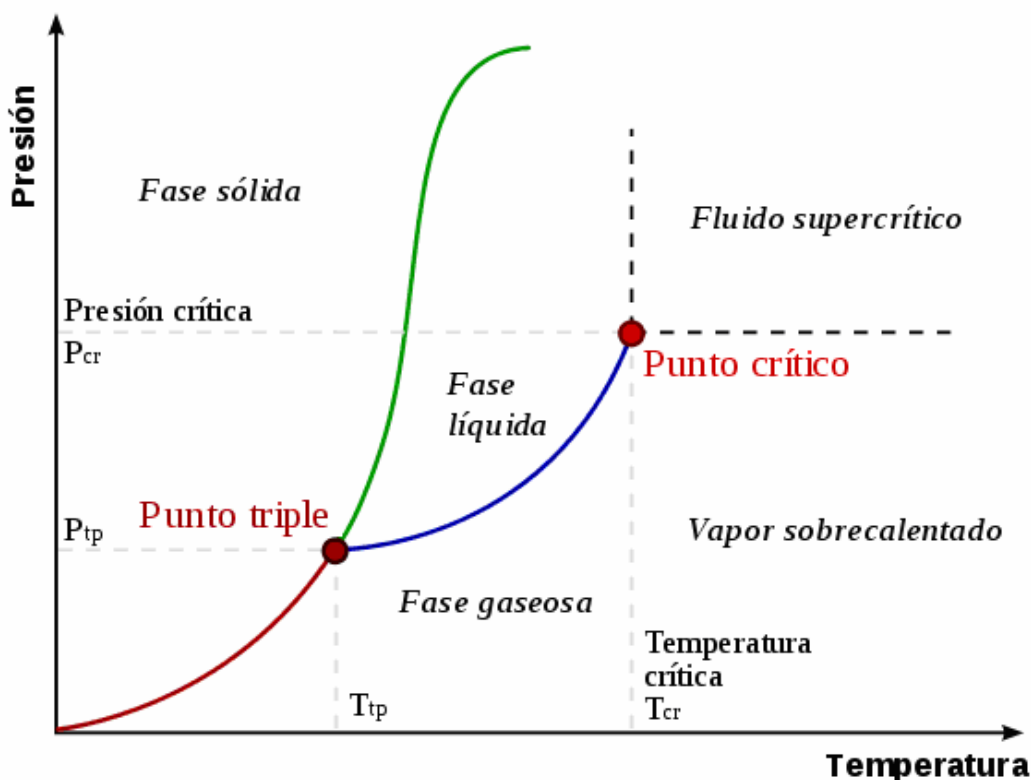


Figura 20. Diagrama de fases sólido/líquido/gas. P_{tp} : presión punto triple, T_{tp} : temperatura punto triple, línea roja: curva de sublimación, línea verde: curva de fusión, línea azul: curva de vaporización.

En este diagrama aparecen tres regiones diferenciales que corresponden a tres de los estados de agregación de materia: sólido, líquido y gaseoso. Estas tres regiones están separadas por líneas representativas de los equilibrios entre las fases: curva de vaporización, curva de fusión y curva de sublimación. El cambio entre las fases se consigue variando la presión y/o la temperatura con adición o extracción de energía.

En el diagrama de la Figura 20 aparecen también dos puntos singulares: uno, situado donde convergen las tres curvas, es el punto triple y representa el estado de equilibrio en el que coexisten las fases sólida, líquida y gaseosa y el otro, ubicado al

final de la curva de vaporización que representa las condiciones de presión y temperatura en las que dejan de existir como tales las fases líquida y gaseosa para dar lugar a otra región distinta. Este punto se denomina punto crítico y las condiciones a las que se alcanza respectivamente presión crítica (P_c) y temperatura crítica (T_c).

La región que aparece por encima del punto crítico se conoce con el nombre de región supercrítica, mientras que la nueva fase se denomina fluido supercrítico (FSC). Los FSC poseen unas propiedades típicas, lo que habitualmente se denomina como “un híbrido entre un líquido y un gas”, es decir, puede difundir como un gas, y disolver materiales como un líquido. Los FSC se caracterizan por el amplio rango de densidades que pueden adoptar. Por encima de las condiciones críticas, pequeños cambios en la presión y la temperatura producen grandes cambios en la densidad.

Muchas sustancias tienen temperaturas críticas no muy alejadas de las ambientales, lo que es una ventaja desde el punto de vista tanto técnico como económico.

Las siguientes características son comunes a los fluidos supercríticos:

- No existe interfase gas-líquido.
- La compresibilidad isotérmica se hace infinitamente positiva.
- El coeficiente de expansión térmica es infinito y positivo.
- La entalpía de vaporización es cero.
- Si la densidad se mantiene constante e igual a la densidad crítica la capacidad calorífica a volumen constante tiende al infinito.
- La densidad por encima del punto crítico depende básicamente de la presión y la temperatura, pero en cualquier caso está más cercana a la de los líquidos que a la de los gases. La densidad aumenta si lo hace la presión a temperatura constante y si disminuye la temperatura a presión constante.
- La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas muy favorables.
- La bajísima tensión superficial permite una alta penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empacados.
- Mayores coeficientes de difusión (difusividad) que en líquidos por lo que la transferencia de materia es más favorable.

En la Figura 21 se ilustran algunas de las propiedades de los fluidos supercríticos. En esta figura se ha representado la densidad reducida (ρ_R) de una sustancia pura frente a la presión reducida (P_R) para distintas líneas de temperatura reducida (T_R) constante (las propiedades reducidas se definen como el cociente entre la propiedad y la propiedad crítica). Según esta figura, la densidad de la sustancia pura puede variar de dos formas muy distintas al variar isotérmicamente la presión.

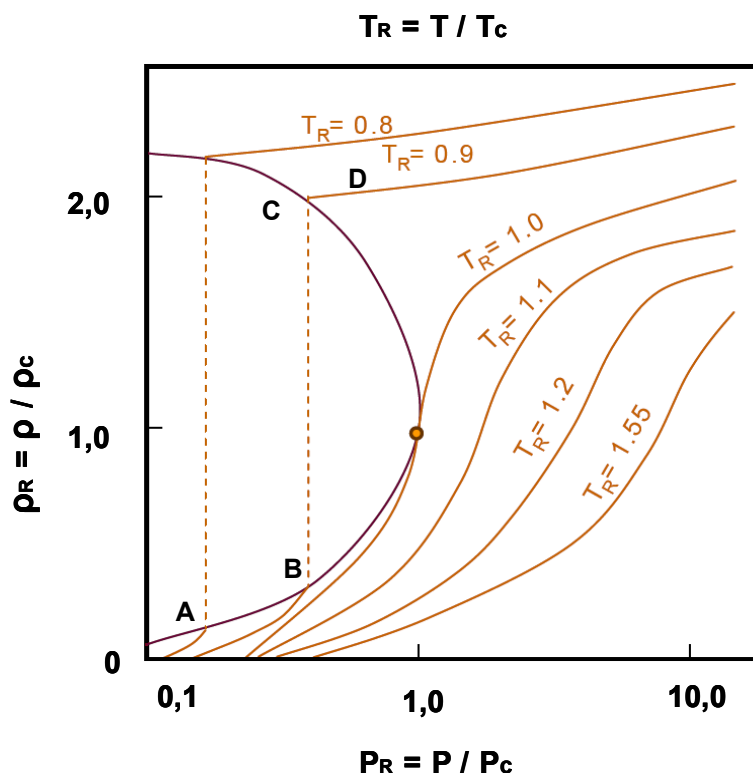


Figura 21. Diagrama de fases del CO_2 (P , T y ρ)

En efecto, al aumentar isotérmicamente la presión partiendo de una temperatura inferior a la crítica (por ejemplo $T_R = 0,9$) y una presión baja (punto A), la densidad aumenta siguiendo una variación típica de los gases hasta llegar al punto B. Cuando se alcanza este punto se produce un cambio de fase sin que se modifiquen las condiciones de presión y temperatura, de manera que la densidad cambia bruscamente de un valor bajo propio de los gases a un valor alto típico de los líquidos (punto C). A partir del punto C son necesarios enormes aumentos de presión para conseguir solo pequeños cambios de la densidad (punto D), comportamiento normal de los líquidos.

En cambio, si se parte de una temperatura superior a la crítica (por ejemplo $T_R = 1.04$) el aumento isotérmico de la presión produce un aumento de la densidad, desde valores bajos propios de los gases hasta valores altos propios de los líquidos sin que se produzca ningún cambio de fase.

Este hecho es de gran importancia si se considera que el poder disolvente de cada sustancia pura depende de su densidad. De esta forma, el poder disolvente de los fluidos supercríticos puede ser bajo (como el de los gases) o puede ser alto (como el de los líquidos) dependiendo de la presión y la temperatura.

Es más, el poder disolvente de los fluidos puede ser modificado de forma continua desde valores bajos a valores altos simplemente variando ligeramente la presión o la temperatura puesto que en el proceso no se produce cambio de fase. Este hecho puede ser utilizado para aumentar la selectividad de los FSC y desde luego lo es para realizar el fraccionamiento de solutos múltiples por reducción paulatina de la densidad del disolvente.

Además de la densidad típica de un líquido que poseen los fluidos supercríticos, estos presentan otras propiedades físico-químicas que contribuyen a que sean unos disolventes especiales. Estas propiedades que inciden directamente sobre la velocidad y la transferencia de masa y calor, son la viscosidad y la difusividad. En la Tabla 7 se muestran los órdenes de magnitud de la densidad y viscosidad de fluidos supercrítico junto a los valores correspondientes a líquidos y gases.

Tabla 7. Densidad, difusividad y viscosidad de líquidos típicos, gases y fluidos supercríticos.

Propiedades físico-químicas	Líquido	Fluido supercrítico	Gas
<i>Densidad (g/ml)</i>	1	0,2 – 0,9	10^{-3}
<i>Viscosidad (g/cm·s)</i>	10^{-2}	$10^{-4} - 10^{-3}$	10^{-4}
<i>Difusividad (cm²/s)</i>	10^{-6}	10^{-3}	10^{-1}

La difusividad es dos o tres órdenes de magnitud mayor que la de un líquido, mientras que la viscosidad es similar a la de un gas, por lo que existe una mayor velocidad de transferencia de masa de los solutos de la matriz al seno del fluido. Así los fluidos supercríticos son únicos ya que tienen el poder de solvatación de los líquidos y las características de transporte de los gases. Por estas razones, la eficiencia y la velocidad de extracción de matrices porosas son usualmente mayores que con líquidos.

Otra ventaja adicional de la técnica de extracción con fluidos supercríticos (SFE) se produce cuando el fluido utilizado tiene la propiedad de ser gas a presión atmosférica (CO_2 , N_2O , etc.). En estos casos el agente extractor puede dejarse escapar a la atmósfera tras la etapa de extracción y recoger los analitos sin disolventes (o en un pequeño volumen de disolvente si se utiliza modificador). Esto permite obtener extractos finales listos para ser analizados sin necesidad de efectuar posteriores etapas de concentración. Además, el gas empleado como fluido supercrítico se puede recircular, permitiendo su reutilización, lo cual reduce los costes de esta tecnología.

3.2. Elección del solvente

Las propiedades de un fluido supercrítico son de capital importancia cuando se considera la selección de un fluido como solvente. El operador debe tener en mente que el fluido debe solubilizar el soluto de interés, así como presentar las características de transferencia de materia requeridas para una extracción rápida. Dos de los parámetros de suma importancia cuando se considera la selección de un fluido supercrítico son la presión crítica (P_c) y la temperatura crítica (T_c). Cuando un fluido se encuentra en condiciones por encima de valores críticos, un aumento de la presión no originará una licuefacción, así como una disminución de la temperatura no origina un líquido.

La presión crítica puede dar cierta idea, en una primera aproximación, de la magnitud del poder de solvatación en estado condensado, y por lo tanto puede usarse como un criterio para escoger anticipadamente el disolvente, en base a la polaridad de los compuestos a extraer. Por ejemplo, el etileno tiene una presión crítica menor que el dióxido de carbono. Basando en este criterio, el etileno tendrá una capacidad menor a la

hora de disolver solutos con polaridad moderada, en contraposición al dióxido de carbono.

La temperatura crítica influye tanto a nivel de las propiedades del fluido, las características de soluto, así como a nivel del efecto matriz. Teóricamente, la máxima capacidad extractiva se obtiene seleccionando una temperatura que se encuentre lo más cercana a la temperatura crítica del fluido escogido.

Los criterios para la elección de un buen disolvente son los habituales en un proceso de extracción convencional: selectividad, solubilidad del soluto, no reactividad, baja viscosidad, además es deseable un producto no inflamable, no tóxico y barato.

El CO₂ supercrítico es el disolvente preferido ya que es medioambientalmente aceptable, barato, asequible en grandes cantidades y con alta pureza, relativamente inerte, pero que potencialmente puede reaccionar en condiciones extremas de alta temperatura y presión (una situación frecuente en la SFE) especialmente con aminas primarias y secundarias, con coeficientes de difusión altos, viscosidad baja y presión y temperatura críticas fácilmente alcanzables con la tecnología existente. A pesar de que el dióxido de carbono en estado supercrítico extrae preferentemente compuestos no polares debido al momento dipolar nulo que presenta, éste puede exhibir un momento dipolar inducido, permitiendo la extracción de una gran variedad de productos de polaridad moderada en la fase del fluido.

En el caso de extracción de compuestos polares, se prefiere la utilización de fluidos polares tales como H₂O y NH₃.

En la Tabla 8 se resumen las ventajas que presenta el CO₂ supercrítico como disolvente.

Tabla 8. Propiedades del dióxido de carbono como disolvente supercrítico

Equilibrio entre fases

- Buen disolvente de gran variedad de productos orgánicos.
- La solubilidad mutua con el agua es pequeña.
- Volatilidad relativamente alta comparada con los extractos orgánicos.

Propiedades de transporte

- Baja viscosidad.
- Grandes coeficientes de difusión.

Propiedades termodinámicas

- Condiciones críticas (T y P) asequibles.
- Entalpía de vaporización pequeña.

Seguridad

- No es tóxico.
- No es inflamable.

Economía

- Bajo coste.
 - Fácilmente disponible con alta pureza.
-

En la Tabla 9 se presenta un cuadro con los disolventes más utilizados hasta el momento en la extracción supercrítica, al mismo tiempo que se indican sus parámetros críticos.

Tabla 9. Propiedades críticas de los disolventes más usados en extracción supercrítica. Temperatura crítica (T_c), presión crítica (P_c), densidad crítica (ρ_c).

Tipo de fluido	Compuesto	P_c (bar)	T_c (°C)	ρ_c (g/ml)
Inorgánico	Dióxido de carbono	72,0	31,1	0,47
	Amoníaco	109,8	132,5	0,23
	Agua	214,8	374,2	0,32
Oxigenados	Metanol	78,9	239,0	0,27
	Etanol	72,0	243,4	0,28
	Acetona	47,0	235,0	0,28
	Éter etílico	35,2	193,9	0,26
Hidrocarburos	Metano	46,0	-82,6	0,17
	Etano	47,6	32,3	0,20
	Etileno	49,8	9,0	0,22
	n-Propano	42,4	96,7	0,22
	n-Butano	70,6	152,0	0,23
	n-Pentano	32,9	196,0	0,23
	n-Hexano	30,1	234,2	0,23
Nitrogenados	Acetonitrilo	47,7	274,8	0,25
	Piridina	56,3	347,0	0,31
	Dióxido de nitrógeno	100,0	158,3	0,27

Como puede observarse en esta tabla, el campo de disolventes utilizables en extracción supercrítica cubre un intervalo muy amplio de temperaturas de operación y varía considerablemente en cuanto a la polaridad de los disolventes se refiere.

3.3. Modificadores

En la mayoría de los casos en que se aplica la SFE, sobre todo cuando se trata de compuestos muy polares o de muestras ambientales, es necesaria la adición de disolventes al dióxido de carbono para aumentar la solubilidad del soluto en el medio extractor. Dichos compuestos, llamados generalmente modificadores, son por lo general disolventes orgánicos de uso común, que se agregan directamente a la celda de extracción (modo estático) o por medio de una bomba auxiliar en donde se mezclan previamente con el fluido antes de pasar por la muestra a extraer (modo dinámico), o vienen mezclados con el solvente en la botella. Es posible añadir un sinnúmero de sustancias con el objeto de aumentar la eficiencia de extracción. Con la adición de un modificador a un fluido supercrítico no sólo se aumentan la solubilidad del soluto a extraer, los coeficientes de transferencia de materia y la difusividad efectiva, sino que actúa también como un factor de separación entre el soluto que interacciona con la matriz y el solvente de extracción. El uso de modificadores es de gran ayuda para evitar pérdidas a la hora de la descompresión, ya que facilita la separación del soluto en el fluido supercrítico, al encontrarse previamente disuelto el soluto en el modificador.

Actualmente no existe una teoría sólida que puede predecir satisfactoriamente el efecto de la adición de un modificador en la solubilidad de un soluto en una fase en estado supercrítico. El efecto en la eficiencia de extracción de un modificador en particular, debe ser ampliamente estudiado y determinado mediante observaciones experimentales.

El uso de un modificador en SFE requiere de ciertas consideraciones por parte del manipulador con respecto a las condiciones de extracción. Por ejemplo, la adición de un disolvente en el agente extractante repercute en las propiedades físicas (punto crítico) de este si se compara con su estado puro. Por lo tanto, es importante poder reconocer la magnitud de estos cambios, para así ajustar los parámetros experimentales con el propósito de poder llevar a cabo una extracción en condiciones supercríticas. Existen trabajos citados en la bibliografía [456] en donde se describen extracciones en condiciones subcríticas. Es de suponer que las propiedades extractivas de los fluidos cambian de manera gradual alrededor del punto crítico.

Por otro lado, la miscibilidad de un modificador en un fluido supercrítico está determinada por la presión y la temperatura de extracción. La cantidad de disolvente que puede ser incorporada a la fase fluida estará condicionada por factores relacionados con su miscibilidad o no miscibilidad. Es crucial asegurarse que en las condiciones preestablecidas de extracción, el sistema presente una sola fase extractiva, para evitar complicaciones inherentes debido a los equilibrios de reparto de los solutos entre las diferentes fases. De esta manera, el control, la eficiencia y la reproducibilidad del método no se verán afectados. La presencia de un modificador en exceso repercutirá en una disminución en la eficiencia de la extracción.

Es importante evitar reacciones colaterales entre los diferentes componentes del sistema soluto-matriz-fluido. La probabilidad de que esto ocurra aumenta cuando se incorporan modificadores al agente extractante, ya sea formando parte activa como reactivo o como catalizador de la misma reacción.

En la actualidad se ha ampliado el uso y variedad de modificadores aplicados a una gama amplia de muestras, con lo que se han perfeccionado extracciones selectivas de productos particulares. Los modificadores polares más utilizados son: metanol, acetonitrilo, benceno y H₂O.

Cabe destacar que para la obtención de ingredientes alimentarios, sólo se deberían emplear como modificadores compuestos declarados GRAS (Generally Recognized As Safe) por las autoridades competentes en materia alimentaria como son la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), la FAO (Food and Agriculture Organization, Naciones Unidas) o la EFSA (European Food Safety Authority, Unión Europea), tales como el etanol y el agua.

3.4. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE)

3.4.1. Instrumentación

La instrumentación necesaria para realizar una extracción con fluidos supercríticos se muestra en la Figura 22. Básicamente, el sistema de extracción consiste en una botella de CO₂ (o de otro solvente), una bomba de alta presión, una celda de extracción, una zona en la que se produce la descompresión del fluido (normalmente llamada separadores), unos intercambiadores de calor y unos controladores de presión (manuales y/o automáticos). Si se utiliza modificador, se necesitaría otra bomba para el disolvente.

Dado que los alimentos suelen ser mezclas altamente complejas, lo más habitual es que los extractos obtenidos también lo sean. Por ello es muy frecuente tener que realizar un fraccionamiento de extractos. El fraccionamiento en condiciones supercríticas consiste en una caída en cascada de la densidad (disminución progresiva del poder disolvente) con la consiguiente precipitación en cascada de los compuestos extraídos en los separadores donde se produce esta disminución de densidad. Para poder realizar fraccionamiento supercrítico se requieren, al menos, dos separadores. Además, si se quiere hacer una recirculación de CO₂, lo único necesario sería eliminar del CO₂ en fase gas sustancias que lleve por arrastre, compuestos volátiles y humedad con filtros adecuados (*demister* o antivaho, relleno de carbón activo por ejemplo) situados a la salida de los separadores y después, una vez limpio de impurezas, licuarlo con un intercambiador de calor (etapa de enfriado) para poder ser de nuevo bombeado.

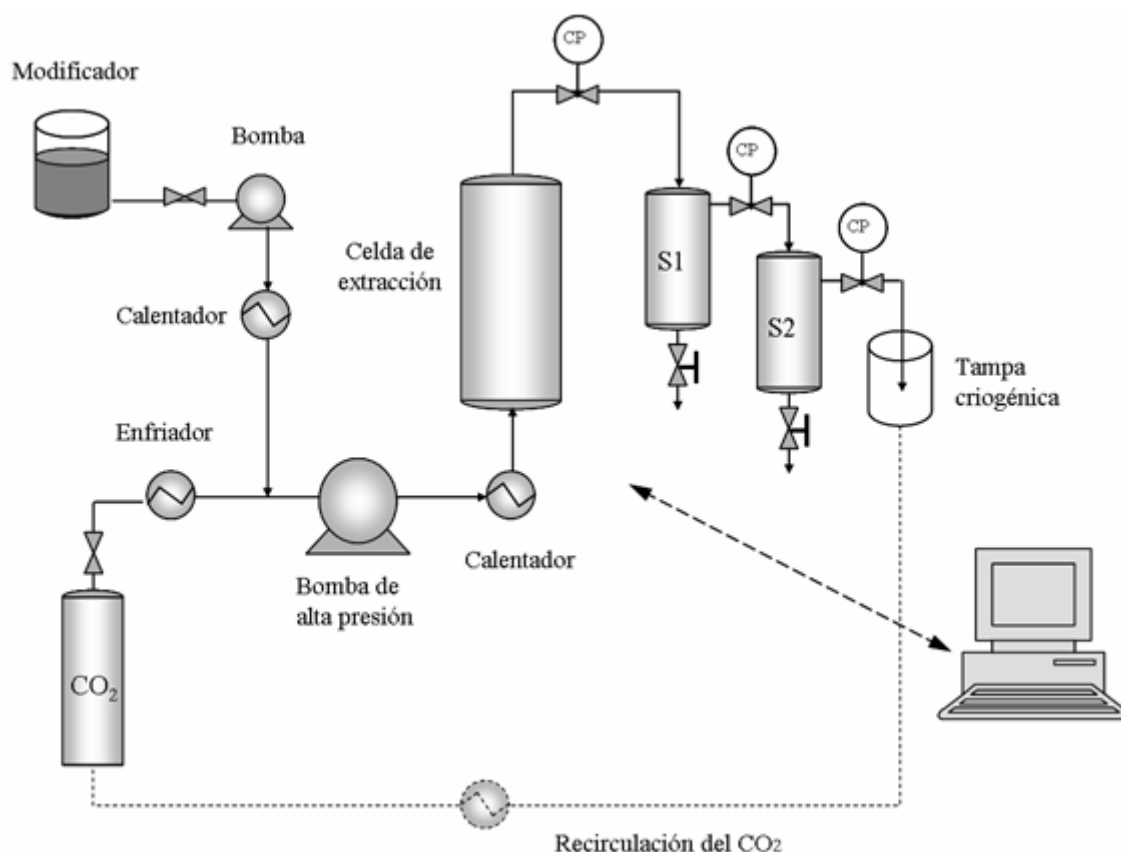


Figura 22. Esquema de una planta de extracción de sólidos por fluidos supercríticos (CO₂). CP: controlador de presión, S1: separador uno, S2: separador dos. El CO₂ procedente de la botella es impulsado por una bomba de alta presión hasta que en la celda de extracción, donde se encuentra la materia prima a extraer, se alcanza la presión de trabajo. Esta presión es controlada por los controladores de presión (CP). La celda de extracción se encuentra termostatzada para poder operar en condiciones de temperatura controlada (superior a la T_C). Los componentes de la materia prima disueltos o arrastrados por el CO₂ precipitan en los separadores (S1, S2) debido a la disminución del poder solvente del CO₂ al reducir la presión. En caso de que sea necesaria la adición de modificadores, éstos suelen mezclarse con la corriente de CO₂ a “baja presión” antes de la bomba de CO₂.

En general, los sistemas comerciales están constituidos por bombas que permiten trabajar a presiones comprendidas entre 100 y 700 atm, siendo capaces de suministrar el fluido a presión y flujo constantes, y de mantener la presión seleccionada a lo largo de todo el sistema de extracción. El extractor propiamente dicho consta de una o varias celdas de extracción, donde se sitúa la muestra, y de un sistema adecuado que permite fijar y mantener la temperatura del fluido durante toda la etapa de extracción. Las temperaturas usuales de trabajo oscilan entre 30 y 150 °C. El tamaño de las celdas de

extracción puede variar ampliamente, desde unos volúmenes típicos a escala laboratorio que oscilan entre 0,5 y 10 ml, hasta 0,2-0,5 L a escala planta piloto.

La parte del equipo donde se produce la descompresión del fluido (separador) suele consistir en un simple tubo capilar de pequeño diámetro interno, metálico o de sílice fundida (separador fijo), o bien en una serie de válvulas micrométricas que permiten controlar de forma mecánica el diámetro del orificio de salida del separador (separador variable). La temperatura de la zona del separador también suele estar termostatzada con el fin de evitar que los analitos extraídos precipiten dentro de él y lo obturen, ya que cuando se utilizan fluidos que son gases a presión ambiente (que es lo más usual), la expansión de éstos durante el proceso de descompresión produce un fuerte enfriamiento.

El diseño del sistema utilizado para recoger los analitos es un factor decisivo para conseguir que las extracciones sean efectivas. Este puede consistir en un simple vial o tubo de ensayo conteniendo un pequeño volumen de disolvente orgánico, en el que se hace burbujear el fluido a la salida del separador, o en sistemas más complejos, como aquellos que utilizan cartuchos de un material adsorbente enfriados criogénicamente. También existen separadores ciclónicos, que son dispositivos que se basan en crear un movimiento rotativo al fluido supercrítico, para que durante la descompresión, por fuerza centrífuga, las partículas pesadas vayan al exterior y el fluido, que es más liviano, vaya al interior, donde hay un tubo de drenaje. Una vez finalizado el proceso de extracción, los extractos obtenidos pueden pasar a ser analizados en el correspondiente sistema cromatográfico sin necesidad de realizar posteriores etapas de concentración (Off-line SFE).

En SFE también existe la posibilidad de acoplar directamente el equipo de extracción al equipo cromatográfico utilizado para el análisis (On-line SFE). En este caso, los analitos extraídos son transferidos y recogidos en el «loop» de inyección, en una trampa técnica o adsorbente situada antes de la columna, o incluso en la misma fase estacionaria en la cabeza de la columna. En bibliografía pueden encontrarse descritas distintas aplicaciones de la técnica SFE acoplada «on-line» a cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidas de alta resolución (HPLC) y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Esta posibilidad de acoplamiento «on-line» representa, sin duda,

otra ventaja de la técnica SFE frente a las extracciones convencionales, ya que permite una fácil automatización del proceso analítico completo. Además, el acoplamiento «on-line» es inherentemente más sensible, ya que todo el analito extraído es introducido en el sistema cromatográfico.

3.4.2. Tipos de extracción

La extracción con fluidos supercríticos es un proceso de separación que depende básicamente de dos factores: transferencia de materia y equilibrio de fases [457], y al igual que las extracciones con disolventes líquidos, puede llevarse a cabo de forma estática o de forma dinámica. En la forma estática, la celda de extracción es presurizada con el fluido manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor. Una vez finalizada la extracción, dicha válvula es abierta, pasando el fluido con los analitos extraídos al sistema de colección. En el modelo dinámico, el fluido en estado supercrítico se deja fluir de forma continua a través de la celda de extracción, manteniendo las válvulas de entrada y de salida del extractor abiertas durante todo el período de extracción. En este caso el flujo del fluido a través del sistema de extracción viene fijado, fundamentalmente, por la presión de trabajo y por las características del separador (longitud y diámetro interno en el caso de los separadores fijos).

En principio, cabe pensar que la extracción dinámica dé mejores y más rápidas recuperaciones, ya que con esta forma de recuperación, durante todo el proceso de extracción, se produce la continua renovación del fluido que entra en contacto con la muestra, lo que hace que sea difícil que el fluido pueda llegar a saturarse. No obstante, el modelo estático permite una mayor penetración del fluido en los poros de la matriz de la muestra, así como el que se pueda alcanzar el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Esta es la razón de que, en la práctica, las extracciones suelen llevarse a cabo realizando una extracción estática, a la que sigue un período de extracción dinámica (extracción estática/dinámica).

Cuando el material de partida es sólido, la estrategia se basa en la difusión del CO₂ supercrítico a través de la matriz sólida. En cambio, cuando el material que se quiere procesar es líquido o es un semisólido bombeable, el proceso que se lleva a cabo es una extracción en columna en contracorriente (CC-SFE), en el que el CO₂ se

introduce por la parte inferior y la muestra por la parte superior de la columna (Figura 23). La columna tiene en su interior un relleno que puede ser de diversos materiales y composición, y que sirve para aumentar el tiempo de residencia y la superficie de contacto de la muestra líquida con el CO_2 .

Estos procesos se pueden llevar a cabo de forma continua, lo que supone una ventaja comercial [458]. En este tipo de procesos, se obtiene de este modo, un extracto con CO_2 , en la parte superior de la columna, y una mezcla de compuestos no extraídos por el CO_2 supercrítico en la parte inferior de la columna, que recibe el nombre de fracción no extraída.

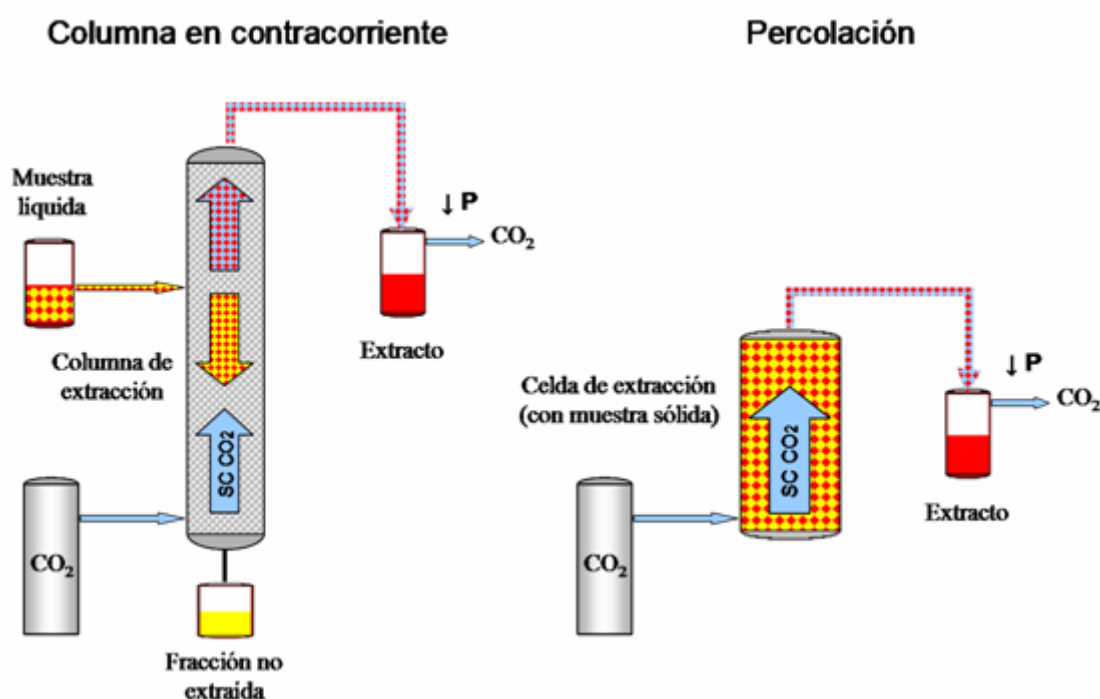


Figura 23. Esquema de los procesos de extracción supercrítica de muestras sólidas y líquidas.

Anteriormente se ha mencionado que en determinadas aplicaciones puede ser necesaria la utilización de fluidos supercríticos modificados. En estos casos, la forma de adicionar el modificador también puede ser realizada de formas diferentes. La forma más sencilla consiste en añadir el modificador directamente a la muestra inmediatamente antes de proceder a la extracción (adición estática). La otra posibilidad es utilizar un fluido previamente modificado (adición dinámica), el cual puede adquirirse en el mercado ya preparado, o bien puede prepararse «in situ», antes de

iniciar la extracción, utilizando una segunda bomba de presión. Esta última forma de adicionar el modificador presenta la ventaja de permitir trabajar con una gran variedad de modificadores y la posibilidad de controlar la composición de la mezcla fluido/modificador.

3.4.3. Variables SFE

Cuando se quiere desarrollar un método SFE, además de seleccionar el agente extractor (fluido supercrítico) adecuado para una determinada combinación analito/matriz, es necesario optimizar las diferentes variables que influyen en el proceso de extracción y en el de colección de los analitos. Las principales variables a tener en cuenta son: densidad del fluido (presión y/o temperatura), tipo de extracción (dinámica, estática), volumen y velocidad del fluido o tiempo de extracción, modificador (tipo y forma de adición), características de la muestra (tamaño de partícula, grado de humedad, etc.), tipo de separador, y sistema de colección (tipo y volumen de disolvente o material adsorbente y disolvente de elución, temperatura, etc.).

Tradicionalmente, la elección de las condiciones de extracción ha estado condicionada por la presión y la temperatura a la cual el analito presentaba un valor máximo de solubilidad en el fluido supercrítico utilizado. Sin embargo, tanto los modelos teóricos desarrollados para explicar el proceso SFE a escala analítica, como muchos de los estudios experimentales que se han realizado, han puesto de manifiesto que las limitaciones que presenta esta técnica para ser aplicada a algunos analitos/matrices (fundamentalmente analitos polares en matrices polares) están determinadas, no por problemas de solubilidad del analito en el fluido supercrítico, sino más bien por consideraciones de tipo cinético, determinadas a su vez por la forma en la que el analito se encuentra inicialmente distribuido en la matriz de la muestra, y por la eficacia del fluido supercrítico para competir con el analito por los centros de adsorción de la misma. Por este motivo, la preparación de la muestra es también un parámetro importante para conseguir una buena transferencia de materia, la cual dependerá del tamaño de partícula o la estructura del material de partida si es un sólido, o del flujo de muestra cuando el material de partida es un líquido.

En el caso de extracciones supercríticas de muestras líquidas, además de los factores citados anteriormente, la transferencia de materia también depende del material de relleno de la columna y del punto de introducción de muestra cuando se trate de un proceso de extracción en columna en contracorriente [458]. La relación entre el flujo de CO_2 y el flujo de muestra de alimentación se denomina relación disolvente/alimentación, ó S/F (*Solvent to Feed*). La relación S/F es una variable que tiene gran relevancia en la transferencia de materia y el equilibrio de fases en procesos de extracción en columna en contracorriente.

Controlando estos factores se pueden optimizar las condiciones de solubilidad y transferencia de materia y, de este modo, diseñar procesos de extracción con CO_2 supercrítico eficaces.

3.4.4. Ventajas y desventajas de la extracción supercrítica

Entre las ventajas de la extracción supercrítica, se encuentran las siguientes:

- Operar a temperaturas bajas permite que los compuestos sensibles al calor no sean deteriorados durante los procesos de extracción.
- La recuperación del soluto y del disolvente es relativamente fácil a partir de las soluciones supercríticas, ya que el disolvente en estado supercrítico puede recuperarse como un gas simplemente reduciendo la presión y/o aumentando la temperatura.
- Los compuestos con alto punto de ebullición pueden extraerse a temperaturas relativamente bajas.
- Si se separan componentes alimenticios, al utilizar disolventes no tóxicos como el dióxido de carbono, no quedan residuos perjudiciales.
- En general se difunde más rápidamente a través de un disolvente supercrítico que a través de un disolvente líquido debido a las mejores propiedades de transporte.

Entre los inconvenientes que presenta llevar a la práctica industrial un proceso de extracción con disolventes supercríticos se pueden citar los siguientes:

- Es necesario trabajar a presión elevada y esto provoca reticencias en la industria por razones de mantenimiento y de seguridad.

- Los costes de la planta son altos y, por lo tanto, el riesgo del capital invertido también es alto.

Tabla 10. Comparación entre la extracción con CO₂ supercrítico y la extracción con disolventes

Extracción con disolventes	Extracción supercrítica
1) Uso de altas temperaturas	Posibilidad de trabajar a bajas temperaturas (entre 40-80 ° C)
2) La muestra está en contacto con el oxígeno del aire, pudiéndose oxidar	Protección contra el oxígeno y minimización de riesgos de oxidación de la muestra
3) Altos tiempos de extracción	Rapidez de extracción
4) La presencia de disolventes es inevitable. El nivel de residuo (en general ppm) del disolvente depende del tipo de solvente utilizado	Totalmente libre de disolventes y, por lo tanto, muy pura
5) La presencia de metales pesados es inevitable y depende de la solvencia, el método de reciclaje de solventes, el origen de la materia prima y el material utilizado para construir las piezas de contacto de la máquina	Totalmente libre de metales pesados, ya que no son extraíbles, incluso si están presentes en la materia prima. No hay metales pesados en el CO ₂ o en el equipo
6) El contenido de sales inorgánicas no se puede evitar, utilizando el mismo concepto anterior	Totalmente libre de sales inorgánicas, utilizando la misma explicación anterior
7) Las sustancias polares se disuelven junto con las sustancias lipofílicas de la materia prima debido a la poca selectividad del disolvente.	El CO ₂ es altamente selectivo para las sustancias apolares y no existe la posibilidad de que las sustancias formen polímeros polares u otros artefactos
Durante las operaciones de separación del disolvente, se pueden formar artefactos (polímeros polares) que conducen a la decoloración de la extracción, dando un aspecto distinto de los componentes	

básicos de la materia prima, siendo más un extracto “pseudo-natural”

8) Se extraen tanto los compuestos polares como los apolares	Sólo se extraen los compuestos no polares (a menos que se añada un modificador)
9) La separación del disolvente y la concentración del extracto requieren unidades de operación adicionales que resultan en mayores costos y una menor recuperación de material útil	No se necesitan unidades de operación extras y el rendimiento de los productos es muy alto

3.4.5. Aplicaciones a escala industrial

Los fluidos supercríticos se están utilizando a escala industrial principalmente en los sectores agroalimentario, químico, farmacéutico y cosmético [459, 460]. Entre otras aplicaciones se dirigen a la obtención de extractos herbales a partir de plantas aromáticas (romero, tomillo, etc.) [461-463], extractos para colorantes alimentarios [464], aceites esenciales [465] y lípidos vegetales [464, 466], extracto de lúpulo [467], antioxidantes [468, 469], etc.; el fraccionamiento de bebidas para desalcoholización [470], la mejora de propiedades de alimentos (desgrasado de alimentos, extracción de colesterol de aceites, carnes y lácteos...) [471-473], la descafeinización del café y el té [474, 475], la recuperación de la nicotina del tabaco [476], la obtención de principios activos [477], operaciones de desinfección y esterilización [478], impregnación [479], microencapsulación [480], el fraccionamiento de productos pesados del petróleo [481], eliminación de pesticidas en plantas y alimentos [482, 483], eliminación de hexano de diversas sustancias [484], teñido de tejidos [485], etc.

Se trata, por lo tanto, de una tecnología puntera con grandes posibilidades, ya que es una nueva vía para la obtención de productos de origen natural; permite la adaptación de nuevos productos de calidad con alto valor adecuados a los hábitos de consumo; posibilita el desarrollo de nuevos procesos no contaminantes e inicia el desarrollo de un sector terciario dirigido hacia la nueva tecnología.

Japón y EE.UU. ya están incorporando en sus legislaciones normas que hacen referencia directa o indirecta a prohibiciones sobre el uso de ciertos disolventes orgánicos en los procesos de extracción y de purificación. Esta circunstancia ya está incidiendo de manera significativa en aquellas empresas españolas con vocación exportadora hacia dichos países.

Pese a su demanda creciente y utilización en otros países como EE.UU. o Japón, en España todavía es una tecnología en gran medida desconocida por la industria y algunas de las empresas que la utilizan (por ejemplo: Solutex, Altex) contratan estos servicios en otros países ante la carencia de oferta tecnológica en fluidos supercríticos en nuestro país.

No obstante, la industria española en estos sectores está realizando importantes avances en esta dirección, ya que, por una parte, cada vez se conocen más los resultados negativos que determinados procesos industriales convencionales, y por otra, son más conscientes de la necesidad de dar respuesta a los requerimientos actuales de los consumidores y la legislación (RD. 2667/1998, relativo a los disolventes de extracción).

3.5. Otras aplicaciones de los fluidos supercríticos

Como se ha descrito anteriormente, la principal aplicación de los fluidos supercríticos es su empleo como técnica de extracción y fraccionamiento, pero además, los fluidos en condiciones sub- y supercríticas pueden tener otras aplicaciones, tanto industriales como experimentales:

- Una de las aplicaciones con mayor desarrollo de los fluidos supercríticos es la **cromatografía supercrítica (SFC)**, como técnica analítica y de purificación. La SFC es un tipo de cromatografía en la que la fase móvil es un fluido supercrítico, generalmente CO₂. Las propiedades disolventes de los fluidos supercríticos permiten la disolución selectiva de los analitos al variar la densidad del fluido supercrítico, determinada por su presión y temperatura. La fuerza disolvente de la fase móvil puede también modificarse mediante la adición de un segundo eluyente o modificador.

La SFC presenta una serie de ventajas sobre las técnicas cromatográficas convencionales (GC y HPLC). Comparada con HPLC, la SFC proporciona separaciones rápidas sin emplear disolventes orgánicos (ausencia de residuos tóxicos). Además, las separaciones en SFC son más rápidas que las obtenidas por HPLC debido a que los coeficientes de difusión de los solutos en el fluido supercrítico son del orden de diez veces superiores a los de los líquidos. Esto tiene como resultado una disminución en la resistencia a la transferencia de materia en la columna, permitiendo una más rápida y mejor resolución en la separación. Comparada con la GC, la SFC capilar proporciona una mayor resolución a temperaturas mucho más bajas que las empleadas en GC, lo que da lugar a análisis en cortos periodos de tiempo de compuestos termolábiles.

Es en el campo de la industria farmacéutica donde la SFC analítica ha tenido un mayor desarrollo, ya que proporcionar separaciones en aproximadamente un tercio del tiempo empleado en HPLC en fase inversa [486]. También se emplea a escala preparativa (Prep-SFC), y permite de manera eficaz la obtención de compuestos puros. El interés de la Prep-SFC se basa en la facilidad de recuperar los compuestos aislados mediante una simple descompresión en la que se elimina espontáneamente la fase móvil [487].

La SFC se ha aplicado en el análisis y purificación de una gran variedad de compuestos [488], incluidos productos naturales, medicamentos, alimentos, plaguicidas, herbicidas, surfactantes, polímeros y aditivos para polímeros, combustibles fósiles, petróleo, explosivos y propulsores.

- Los fluidos supercríticos se están usando como **medio de reacción** en la síntesis orgánica de diversos productos, sobre todo en el campo de la química orgánica [489], pero también en el campo de la catálisis enzimática [490, 491] (las tasas de transferencia de materia son mayores que con disolventes líquidos y, además, se pueden integrar los procesos de catálisis y fraccionamiento). Un ejemplo sería la transesterificación de aceite de colza [492] y de soja [493] para la producción de biodiésel en metanol supercrítico.

- Los fluidos supercríticos se pueden utilizar también en la preparación de aerogeles, ya que, debido a su baja tensión superficial, permiten el secado del gel manteniendo su estructura [494]. Estas estructuras se pueden usar para la inmovilización de diferentes catalizadores. Se emplean en catálisis orgánica, inorgánica y enzimática [495].
- Se emplean en nuevos procesos de extrusión que permiten el uso de ingredientes termolábiles como proteínas del suero, vitaminas o compuestos aromáticos [496], sobre todo para la producción de nuevos alimentos funcionales.
- Uno de los nuevos usos que se le están dando a los fluidos supercríticos es la cristalización supercrítica, sobre todo por parte de la industria farmacéutica para el diseño de partículas apropiadas para una administración por vía inhalatoria o parenteral.

Hay diferentes métodos para llevar a cabo la precipitación supercrítica, como son la RESS (*rapid expansion of a supercritical solution*) [497], SAS (*solvent-antisolvent*) [498, 499], atomización supercrítica o la encapsulación supercrítica [500, 501].

4. INTRODUCCION A LA BIOCATALISIS

La afirmación de que la biocatálisis es de gran importancia parece trivial ante el hecho de que biocatálisis es el requisito previo para cualquier tipo de vida. La aplicación de la biocatálisis tiene una larga tradición, si se incluye el empleo involuntario de los procesos que subyacen en los tiempos antiguos, por ejemplo, la fermentación en relación con la fabricación de la cerveza o la cocción de pan. En nuestros días, los resultados de nuevas investigaciones en ingeniería genética, y el descubrimiento de gran cantidad de nuevas enzimas, ha permitido el desarrollo de procesos de biocatálisis con mayor productividad, estabilidad, precisión y facilidad de uso y, hoy en día, se pueden encontrar cada vez más enzimas que pueden catalizar casi cualquier reacción de química orgánica [502]. Los avances modernos en medicina, farmacia, productos nutricionales, análisis, tecnología medioambiental y otros, son inconcebibles sin los resultados innovadores de la investigación en biocatálisis.

4.1. ENZIMAS

Las **enzimas** son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible. En estas reacciones, las moléculas sobre las que actúa la enzima en el comienzo del proceso son llamadas sustratos, y estas los convierten en diferentes moléculas, los productos (Figura 24). Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran en tasas significativas. Generalmente, las enzimas se nombran añadiendo la terminación "asa" a la raíz del nombre de la sustancia sobre la que actúan.

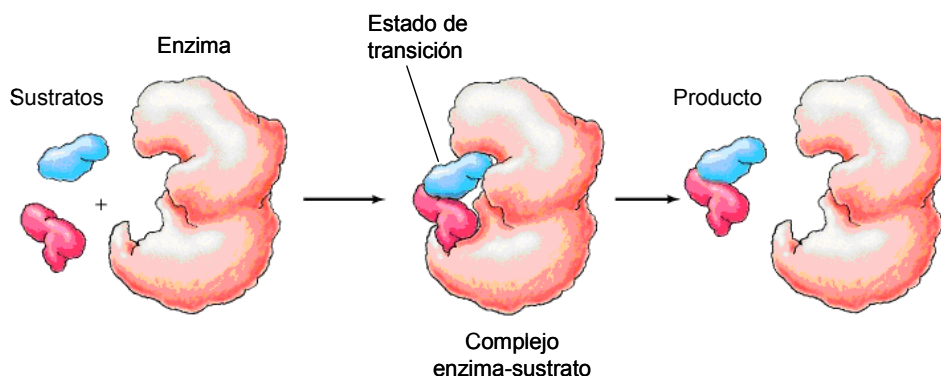


Figura 24. Ejemplo de catálisis enzimática.

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (ΔG^\ddagger) para una reacción (se entiende por "energía de activación" al valor de la energía que es necesario aplicar para que dos moléculas determinadas colisionen y se produzca una reacción química entre ellas), así se acelera substancialmente la tasa de la reacción (Figura 25). Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más deprisa que la correspondiente reacción no catalizada.

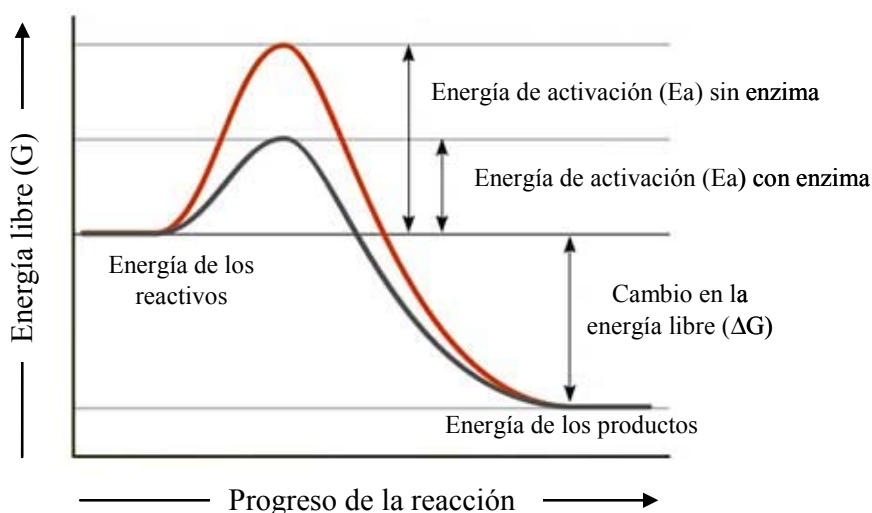


Figura 25. Gráfica de las energías de las diferentes fases de una reacción química. Los sustratos precisan mucha energía para alcanzar el estado de transición, pero una vez alcanzado, se transforman en productos. La enzima estabiliza el estado de transición, reduciendo la energía necesaria para formar los productos.

Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que ellas catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas.

La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Las inhibidoras son moléculas que disminuyen la actividad de las enzimas; mientras que las activadoras son moléculas que incrementan la actividad. Asimismo, gran cantidad de enzimas requieren de cofactores para su actividad. Muchas drogas o fármacos son moléculas inhibidoras. La actividad es afectada por la temperatura, el pH, la concentración del sustrato y otros factores físicoquímicos [502].

Las enzimas para la biocatálisis pueden usarse de varias maneras, pueden ser del tipo salvaje, recombinadas, o genéticamente modificadas para incrementar su actividad o especificidad. Una o más enzimas que llevan a cabo los pasos sintéticos requeridos pueden estar presentes en las células completas de un microorganismo y actuar simultáneamente sin interferencias. El microorganismo involucrado puede estar en pleno crecimiento, en fase estacionaria o inmovilizado. Alternativamente, las enzimas libres pueden estar en solución, en un reactor de membrana, como suspensión, “cross-linked” o inmovilizadas. El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o en dos fases [503-506].

4.1.1. Estructura y mecanismo

Las enzimas son generalmente proteínas globulares que pueden presentar tamaños muy variables. Las actividades de las enzimas vienen determinadas por su estructura tridimensional [507]. Casi todas las enzimas son mucho más grandes que los sustratos donde actúan, y solo una pequeña parte de la enzima (alrededor de 3 a 4 aminoácidos) están directamente involucrados en la catálisis [507]. La región que contiene estos residuos encargados de catalizar la reacción es conocida como centro activo. Las enzimas también pueden contener sitios con la capacidad de unir cofactores, necesarios a veces en el proceso de catálisis, o de unir pequeñas moléculas, como los sustratos o productos (directos o indirectos) de la reacción catalizada. Estas uniones pueden incrementar o disminuir la actividad enzimática, dando lugar así una regulación por retroalimentación (*negativa*: producida por acumulación de producto; *positiva*: inducida por sustratos o cofactores).

Al igual que las demás proteínas, las enzimas se componen de una cadena lineal de aminoácidos que se pliegan durante el proceso de traducción para dar lugar a una estructura terciaria tridimensional de la enzima, susceptible de presentar actividad. Cada secuencia de aminoácidos es única y por tanto da lugar a una estructura única, con propiedades únicas. En ocasiones, proteínas individuales pueden unirse a otras proteínas para formar complejos, en lo que se denomina estructura cuaternaria de las proteínas.

La mayoría de las enzimas, al igual que el resto de proteínas, pueden ser desnaturalizadas si se ven sometidas a agentes desnaturalizantes como el calor, los pHs extremos o ciertos compuestos como el SDS. Estos agentes destruyen la estructura terciaria de las proteínas de forma reversible o irreversible, dependiendo de la enzima.

4.1.2. Especificidad

Las enzimas suelen ser muy específicas tanto del tipo de reacción que catalizan como del sustrato involucrado en la reacción. La forma, la carga y las características hidrofílicas/hidrofóbicas de las enzimas y los sustratos son los responsables de dicha

especificidad. Las enzimas también pueden mostrar un elevado grado de estereoselectividad, regioselectividad y quimioselectividad⁶ [508].

4.1.3. Ventajas y desventajas de la biocatálisis

Ventajas

Las ventajas que los procedimientos biocatalíticos tienen sobre los químicos se basan en que las reacciones catalizadas por enzimas son frecuentemente más regio-, quimio- y estereoselectivas, además de llevarse a cabo en condiciones seguras y muy benignas desde el punto de vista medio-ambiental (Tabla 11). Aquí sería pertinente definir que las biotransformaciones involucradas en los procesos biocatalíticos, son conversiones de sustratos naturales y/o no naturales para las enzimas, ya sean aisladas o presentes en los microorganismos que las contienen.

La quiralidad es un factor determinante en la eficacia de muchos fármacos, agroquímicos y aditivos para alimentos, ya que de ello depende su actividad biológica, por ello la producción de un solo enantiómero de estos compuestos quirales es muy importante en la industria agroquímica, de alimentos y especialmente farmacéutica [509].

Tabla 11. Ventajas y desventajas de la biocatálisis

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Catálisis muy eficiente de las reacciones químicas más conocidas. • Alta regio- y estereoselectividad. • Condiciones de reacción suaves y, por lo tanto, bajo consumo de energía. • Bajas cantidades de subproductos. • Los catalizadores son biodegradables. • La preparación a gran escala es posible a través de la fermentación (enzimas microbianas). • La reutilización es posible (inmovilización). • Los biocatalizadores, en cierta manera, pueden diseñarse. • No son tóxicos si se aplican correctamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las moléculas de proteína son bastante inestables en medios acuosos. • Pueden ser inactivados por: <ul style="list-style-type: none"> - altas temperaturas - valores de pH extremos - altas concentraciones de sales - disolventes orgánicos (polares) • Se pueden inactivar a través de inhibición por: <ul style="list-style-type: none"> - sustrato - producto - iones metálicos - inhibidores - muchas enzimas dependen de cofactores - posibles reacciones alérgicas

⁶ ***Quimioselectividad:*** la capacidad de distinguir y actuar en un subconjunto de compuestos dentro de un gran grupo de compuestos químicamente relacionados.

Estereoselectividad: la capacidad de actuar en un único enantiómero o diastereómero selectivamente.

Regioselectividad: la capacidad de actuar en un lugar de una molécula de forma selectiva.

Aunque la principal aplicación de las biotransformaciones en síntesis orgánica está en la preparación de compuestos enantiopuros, estas también se usan para efectuar transformaciones de grupos funcionales aquirales; ya que las biotransformaciones se llevan a cabo generalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitándose con ello el uso de condiciones de reacción extremas, las cuales pudieran causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones. Las biotransformaciones también encuentran aplicación en la preparación de algunos compuestos en los que la transformación química es, hasta ahora, imposible.

Adicionalmente, cuando el biocatalizador, microorganismos o enzimas aisladas, están inmovilizados se pueden reciclar varias veces sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas. Además, la biocatálisis no es una tecnología excluyente, ya que se puede combinar con la catálisis química o ser empleada en otros procesos biotecnológicos.

Por otro lado, con los avances en la ingeniería genética, las enzimas pueden sobreexpresarse haciendo los procesos biocatalíticos más económicos y eficientes; además los avances en la modificación estructural de las enzimas permite la creación de nuevas moléculas proteicas con actividades catalíticas hechas a la medida de las necesidades, por ejemplo la preparación de enzimas termoestables o estables a cierto pH, por medio de la mutagénesis aleatoria o dirigida.

Cabe destacar que los objetivos presentes del procesado industrial son conseguir una “química verde”, “desarrollo sostenible” y “procesos respetuosos con el medio ambiente”. Estas condiciones son cada vez más importantes en la actualidad y rigen la actividad industrial en una gran parte del mundo. Estos objetivos son mucho más difíciles de lograr sin la disponibilidad de la biocatálisis, que tolera y requiere estas condiciones o premisas [510], considerándose procesos de química verde o procesos GRAS (*Generally Recognized As Safe*), ya que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias peligrosas (Tabla 12).

Tabla 12. Principios de la química verde (fuente: [511])

Principios de la química verde	Notas
1. <i>Prevenir la formación de residuos antes de tratarlos o limpiarlos después de su formación.</i>	
2. <i>Los métodos de síntesis se deben diseñar para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso en el producto final.</i>	
3. <i>En la medida de lo posible, los métodos de síntesis se deben elegir para usar y generar sustancias que tengan baja o nula toxicidad para la salud humana y el medio ambiente.</i>	Los biocatalizadores son productos naturales, sin problemas de toxicidad inherente
4. <i>Los productos químicos se deben elegir para mantener la eficacia de su función mientras se reduce la toxicidad.</i>	
5. <i>Se debe evitar, en la medida de lo posible, el uso de sustancias adicionales (disolventes, agentes de separación, etc.) y deben ser inocuas cuando sea necesario su uso.</i>	Los biocatalizadores se suelen emplear en medios acuosos
6. <i>Los requerimientos energéticos de los procesos deben ser minimizados. Los métodos de síntesis se deben llevar a cabo en condiciones de presión y temperatura ambiente.</i>	La mayoría de los biocatalizadores trabajan tanto a temperatura como a presión ambiente, y en condiciones suaves de pH (entre 5-9).
7. <i>Los materiales de partida deben ser renovables cuando sea técnica y económicamente posible.</i>	Los biocatalizadores se están investigando intensivamente para su aplicación en procesos renovables
8. <i>Deben evitarse, cuando sea posible, procesos de derivatización (bloqueo de grupos, protección/desprotección o modificaciones temporales de procesos químico-físicos).</i>	Los biocatalizadores son, a menudo, regio- y estereoselectivos, obviando la necesidad de pasos de protección / desprotección
9. <i>Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posibles), reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos.</i>	Los biocatalizadores son selectivos y reutilizables (sobre todo si están inmovilizados)
10. <i>Los productos químicos deben ser elegidos para que, al finalizar su función, no permanezcan en el medio ambiente y no afecten a la degradación inocua de los productos.</i>	Los biocatalizadores son, por su naturaleza, biodegradables después de su uso (siempre que no estén inmovilizados en un soporte no biodegradable)
11. <i>Los métodos analíticos deben permitir la supervisión de los procesos en tiempo real, para que exista control antes de que se produzcan sustancias peligrosas.</i>	

12. *Las sustancias empleadas en los procesos químicos no deben tener peligro potencial para provocar accidentes como escapes de gas, explosiones o fuego.*

Una vez más, el uso de biocatalizadores reduce el riesgo de estos peligros

Desventajas

Sin embargo, las enzimas se han ido optimizando, a través de la evolución biológica, para trabajar dentro de complejos ciclos metabólicos sometidos a múltiples niveles de regulación y por ello la mayoría de las veces las enzimas no poseen todas las propiedades necesarias para su implantación como catalizadores en reactores industriales. Las principales desventajas de la biocatálisis enzimática son:

- Las enzimas son inestables en determinados medios de reacción.

Las enzimas son catalizadores solubles, generalmente inestables a altas temperaturas ($>60^{\circ}\text{C}$) y valores de pH extremos, y muy a menudo altamente inhibidos por altas concentraciones de sustratos y productos de reacción. En este sentido, mantener la integridad de la proteína es la clave para mantener la actividad catalítica.

A pesar de esto, hay numerosos ejemplos de enzimas (aspartasas, lipasas, amidasas, etc.), sobre todo inmovilizadas, que muestran una gran estabilidad en condiciones operacionales, presentando vidas medias de semanas e incluso meses [504]. Además, el desarrollo de enzimas termoestables a partir del aislamiento de organismos termófilos o por evolución dirigida [512], promete crear catalizadores aún más robustos para aplicaciones industriales.

- Los procesos son más lentos y menos productivos que los procesos químicos tradicionales.

A menudo se asume que las enzimas y los procesos biocatalíticos tienen una baja productividad en volumen, pudiéndose encontrar muchas citas a este efecto en la literatura. Esta creencia surge, probablemente, por el paralelismo con los procesos de fermentación, donde las productividades volumétricas son casi siempre menos de 1 g / L / h . Sin embargo, un proceso de fermentación suele implicar la biosíntesis de un

metabolito a partir de azúcares y otras materias primas fundamentales, a través de rutas metabólicas complejas de varias etapas.

Si consideramos solo las transformaciones enzimáticas, la situación es más simple, y el resultado puede ser muy diferente. Hay procesos biocatalíticos donde se han logrado productividades de decenas o incluso cientos de gramos por litro de producto por hora mediante procesos de inmovilización de enzimas. Algunos ejemplos de estos procesos altamente productivos incluyen la producción de ácido L-aspartico por aspartasa inmovilizada, la producción de L-fenilalanina mediante una amidasa o una transaminasa, la producción de L-leucina utilizando terc-leucina deshidrogenasa en un reactor de membrana y la producción de ácido 2-cloropropiónico en una esterificación catalizada por lipasa [513].

Además, actualmente los sistemas enzimáticos pueden modificarse. En los últimos años el concepto de ingeniería de enzimas (enzyme engineering) es muy común, y está siendo ampliamente utilizado. Consiste básicamente en la modificación de enzimas, acrecentando sus capacidades catalíticas, modificando sus estructuras con el fin de hacerlas mas productivas o mas controlables. Se define como la mutación de proteínas cuyo fin es, esencialmente, modificar la actividad de la enzima, su pH óptimo o su estabilidad [514]. Con este fin, se cambian secuencias de la enzima, pasando desde un solo aminoácido hasta una secuencia completa.

- No existen enzimas suficientes que catalicen todas las reacciones deseadas a partir de sustratos disponibles

Se estima que de las 25000 enzimas presentes en la naturaleza, solo unas 3800 han sido caracterizadas, y de estas, sólo 400 (principalmente hidrolasas, transferasas y oxidoreductasas) tienen potencial desde el punto de vista comercial. Debido a sus múltiples cualidades, la demanda de enzimas crece año a año y no es posible cubrirla.

Además, en muchas ocasiones las enzimas no presentan las propiedades de actividad, y selectividad optimas cuando deseamos que catalicen procesos diferentes de los naturales (p.e. síntesis, transesterificación, etc. en lugar de hidrólisis) sobre

substratos sintéticos y en condiciones de reacción no-convencionales (pe. en presencia de codisolventes orgánicos).

No obstante, las 3800 enzimas conocidas pueden catalizar casi cualquier reacción, pero sucede que muchas veces no están bien caracterizadas, registradas o no están comercialmente disponibles. Como se expuso anteriormente, los avances en la ingeniería genética y de enzimas están permitiendo que se produzcan enzimas de forma barata, con una mayor eficacia y enfocadas a un determinado proceso. El diseño específico de enzimas abre nuevas e infinitas posibilidades, sobre todo para su uso a nivel industrial. En teoría se podrían obtener enzimas que virtualmente fueran capaces de realizar cualquier tipo de proceso que se realice por vía química. Por ejemplo, se podrían perfectamente crear sistemas enzimáticos capaces de degradar polímeros cuya estructura no permitía anteriormente su degradación. En este sentido, la tecnología biocatalítica mejora a ritmo constante y este inconveniente cada día lo es menos.

- Las enzimas son caras

A primera vista, esta afirmación parece ser casi irrefutable. Las enzimas son, generalmente hablando, caros en precio por mol o por unidad de peso. Sin embargo, el costo a considerar en biocatálisis no es el costo de la enzima en sí, sino más bien, la contribución de la enzima al costo del producto final.

Por ejemplo, la contribución a los gastos de una de las transaminasas para la producción de p-fluoro-L-fenilalanina, que puede tener un precio de venta de 450 € por kilogramo o más, es de sólo 15–25 € por kg; la contribución al gasto de la penicilina-amidasa en la producción de la penicilina G es de sólo 1€ por kg; y la contribución de la aspartasa en la producción de ácido L-aspartico es menos de 0,10 € por kg.

Además, el precio de los biocatalizadores se ha reducido notablemente en los últimos 10 años, debido a la optimización de su producción por parte de las empresas.

Así pues, a pesar de sus extraordinarias propiedades, las enzimas (y los procesos enzimáticos) necesitan generalmente ser mejoradas antes de que pueda procederse a su utilización industrial como catalizadores de química sostenible.

4.1.4. Aplicaciones industriales de las enzimas

La industria de las enzimas como la conocemos hoy en día es el resultado de un rápido desarrollo, sobre todo en los últimos cuatro decenios, gracias a la evolución de la biotecnología moderna. Las enzimas presentes en la naturaleza se han utilizado desde tiempos antiguos en la producción de productos alimenticios, tales como queso, masa madre, cerveza, vino y vinagre, y en la fabricación de productos como el cuero, índigo y lino. Pero en estos procesos se utilizan microorganismos y no enzimas en una forma pura o bien caracterizada. El desarrollo de los procesos de fermentación durante la última parte del siglo pasado, destinadas específicamente a la producción de enzimas por el uso de cepas seleccionadas, hizo posible la fabricación de enzimas como purificados, preparados bien caracterizados, incluso a gran escala. Este desarrollo ha permitido la introducción de enzimas en los productos y procesos industriales, por ejemplo, en los detergentes, los textiles y las industrias de almidón. El uso de la tecnología genética recombinante ha mejorado aún más los procesos de fabricación y ha permitido la comercialización de las enzimas que anteriormente no se podían producir. Además, los últimos avances en la biotecnología moderna, la introducción de la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida, también han revolucionado el desarrollo de enzimas industriales. Estos avances han hecho posible proporcionar que enzimas nuevas a medida y adaptadas a las condiciones del nuevo proceso, permitiendo una mayor expansión de su uso industrial. El resultado es una industria altamente diversificada, que sigue creciendo tanto en términos de tamaño y complejidad (Tabla 13).

Tabla 13. Enzimas usadas en varios segmentos industriales y sus aplicaciones.

Industria	Clase de enzima	Aplicación
Detergentes (lavandería y lavado de platos)	Proteasa	Eliminación de manchas de proteína
	Amilasa	Eliminación de manchas de almidón
	Lipasa	Eliminación de manchas de lípidos
	Celulasa	Limpieza, aclarado de color, anti-redeposición (algodón)
	Mananasa	Eliminación de manchas de mananos

Almidón y combustibles	Amilasa	Licuefacción y sacarificación del almidón
	Amiloglicosidasa	Sacarificación
	Pululanasa	Sacarificación
	Glucosa isomerasa	Conversión de glucosa a fructosa
	Ciclodextrin-glicosiltransferasa	Producción de ciclodextrina
	Xilanasa	Reducción de la viscosidad (combustible y almidón)
	Proteasa	Proteasa (nutrición de la levadura – combustible)
Alimentos (incluido productos lácteos)	Proteasa	Coagulación de la leche, fórmulas infantiles (poco alergénicas), sabor
	Lipasa	Sabor a queso
	Lactasa	Eliminación de la lactosa (leche)
	Pectin metil esterasa	Reafirmantes de productos a base de frutas
	Pectinasa	Productos a base de frutas
	Transglutaminasa	Modificar las propiedades visco-elásticas
Horneado	Amilasa	Suavidad y volumen del pan, ajustes de la harina
	Xilanasa	Acondicionado de la masa
	Lipasa	Estabilidad y acondicionado de la masa (emulsionante <i>in situ</i>)
	Fosfolipasa	Estabilidad y acondicionado de la masa (emulsionante <i>in situ</i>)
	Glucosa oxidasa	Fortalecimiento de la masa
	Lipoxigenasa	Fortalecimiento de la masa, blanqueo del pan
	Proteasa	Pastas, galletas
	Transglutaminasa	Masa laminada resistente
Alimentación animal	Fitasa	Digestibilidad del fitato-liberación de fósforo
	Xilanasa	Digestibilidad
	β -glucanasa	Digestibilidad
Bebidas	Pectinasa	Despectinización, maceración
	Amilasa	Tratamiento de zumos, cerveza baja en calorías
	β -glucanasa	Maceración
	Acetolactato decarboxilasa	Maduración (cerveza)
	Lacasa	Clarificación (zumos), sabor (cerveza), tratamiento del tapón de corcho
Textil	Celulasa	Acabado de vaqueros, ablandamiento del

		algodón
	Pectato liasa	Desgrasado
	Catalasa	Acabado decolorado
	Lacasa	Blanqueamiento
	Peroxidasa	Eliminación de exceso de colorante
Pulpa y papel	Lipasa	Control de resinas, control de contaminantes
	Proteasa	Eliminación de biopelículas bacterianas
	Amilasa	Revestimiento de fécula, destintado, mejora del drenaje
	Xilanasa	Impulsar el blanqueado
	Celulasa	Destintado, mejora del drenaje, modificación de la fibra
Grasas y aceites	Lipasa	Transesterificación
	Fosfolipasa	Desgomado, producción de lisolecitina
Síntesis orgánica	Lipasa	Resolución de alcoholes quirales y amidas
	Acilasa	Síntesis de penicilina semi-sintética
	Nitrilasa	Síntesis de ácidos carboxílicos enantiopuros
Piel	Proteasa	Unhearing, bating (hacer el cuero flexible)
	Lipasa	Decapado (tratamiento previo a la aplicación de pintura)
Cuidado personal	Amiloglucosidasa	Antimicrobiano (combinado con la glucosa oxidasa)
	Glucosa oxidasa	Blanqueamiento, antimicrobiano
	Peroxidasa	Antimicrobiano

Además, debido a la creciente preocupación por el medio ambiente y la reducción de costes, la biotecnología está ganando terreno rápidamente, debido a las diversas ventajas que ofrece frente a las tecnologías convencionales. El campo de las enzimas industriales está experimentando grandes iniciativas de I + D, lo que resulta tanto en el desarrollo de una serie de nuevos productos, como en la mejora de procesos y rendimientos de varios productos ya existentes. Según un informe de Business Communications Company, Inc. el mercado mundial de enzimas industriales en 2009 se estimó en 2,4 mil millones de \$ y se espera que aumente, con una tasa media de crecimiento anual del 3,3%, a 2,7 mil millones de \$ en 2012. El crecimiento anual en volumen de enzimas industriales es de entre un 4% y un 5%, y se acompaña de una reducción de precios. Las enzimas técnicas, como las usadas en los detergentes y en la

fabricación de pulpa y papel, entre otros, son el segmento más grande, con una cuota total del 52%, presentando, en general, con un crecimiento paralelo al resto del mercado.

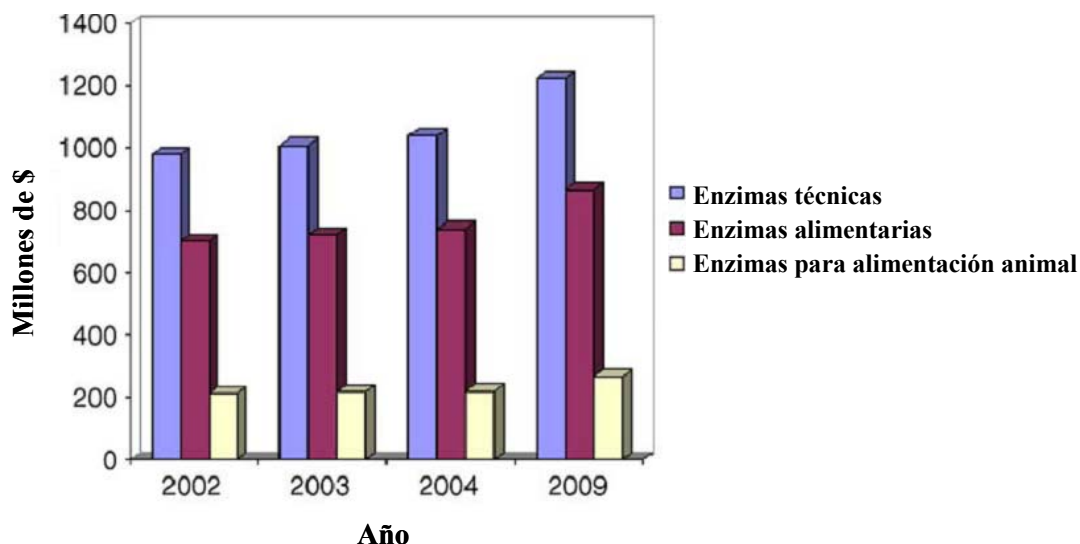


Figura 26. Mercado mundial de las enzimas por sectores de aplicación hasta 2009 (en millones de dólares). Fuente: Business Communications Company, Inc.

4.1.5. Lipasas

Las lipasas (acilglicerolhidrolasas E.C. 3.1.1.3) son enzimas que actúan como catalizadores en reacciones lipolíticas (catabolismo de grasas y aceites) a través de la hidrólisis de los enlaces éster de acilglicerol [515-518]. Pueden catalizar tanto la hidrólisis (en medio acuoso) como la síntesis (sistemas con reducido contenido en agua) de acilglicerol (Figura 27). Estas reacciones suelen proceder con alta regio y/o enantioselectividad, convirtiendo a las lipasas un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica. Las razones del enorme potencial biotecnológico de lipasas microbianas se deben a que:

- son estable en disolventes orgánicos
- no requieren de cofactores
- poseen gran especificidad de sustrato
- muestran una alta enantioselectividad

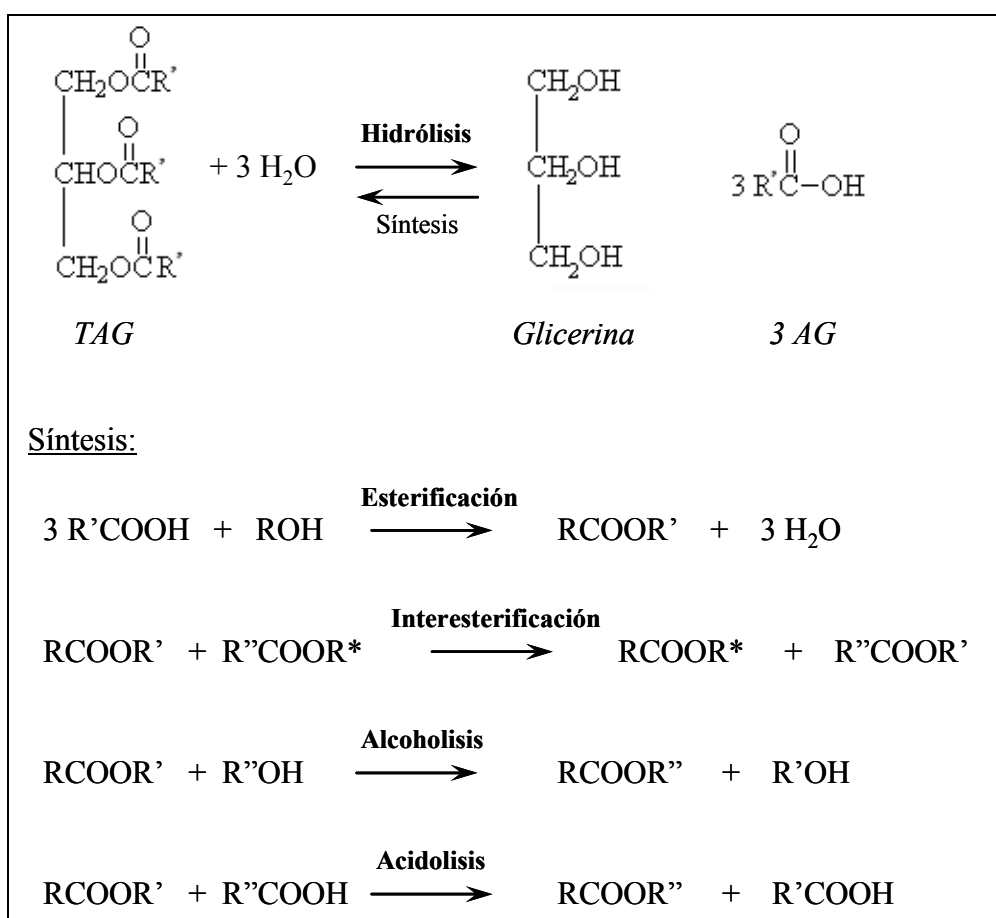


Figura 27. Esquema de las principales reacciones catalizadas por lipasas.

Las lipasas *in vivo* se activan adsorbidas sobre una interfase oleo-acuosa, “activación interfacial”. La mayoría de las lipasas tienen un elemento estructural diferenciador, la tapadera, que está formada por un oligopéptido helicoidal anfipático, que se coloca sobre el centro activo de la lipasa cuando esta inactiva. Tiene dos conformaciones: abierta (en interfase o medio orgánico) y cerrada o inactiva (en medio acuoso). Cuando la lipasa está en una interfase hidrofóbica la tapadera se desplaza dejando libre el sitio activo, produciéndose la llamada activación interfacial. El sitio activo se caracteriza por estar formado por la llamada triada catalítica (Serina-Histidina-Aspartato ó ácido glutámico) que es crucial en todas las reacciones catalizadas por lipasas [517, 518] (Figura 28).

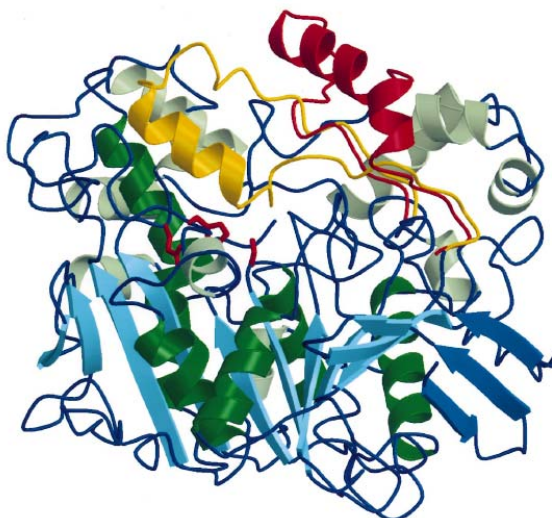


Figura 28. Diagrama de la lipasa de *Candida rugosa* con los estados abierto y cerrado de la tapadera superpuestos. La conformación cerrada de la tapadera (oligopéptido helicoidal) está en amarillo y la abierta en rojo. Los residuos que forman la triada catalítica se muestran en rojo [519].

La Tabla 14 recoge las lipasas microbianas más utilizadas en biotecnología. Cabe señalar que existe una considerable confusión sobre el origen de las lipasas, consecuencia de los cambios en los nombres sistemáticos de las cepas de hongos y bacterias que producen estas lipasas. El interés creciente en las lipasas microbianas se refleja en un creciente número de excelentes monografías y artículos de revisión sobre la biología molecular, las propiedades bioquímicas y, en particular, las aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas [520-523].

Tabla 14. Ejemplos de lipasas microbianas comercialmente disponibles [524]

Origen	Organismo productor de la lipasa	Biotecnología
Fúngico	<i>Candida rugosa</i> ^a	Síntesis orgánica
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesado de alimentos
Bacteriano	<i>Candida Antarctica</i> A/B	Síntesis orgánica
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> ^b	Aditivo de detergentes
	<i>Burkholderia cepacia</i> ^c	Síntesis orgánica
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo de detergentes
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo de detergentes
	<i>Chromobacterium viscosum</i> ^d	Síntesis orgánica
^a El organismo se llamaba anteriormente <i>Candida cylindracea</i> ^b El organismo se llamaba anteriormente <i>Humicola lanuginosa</i> ^c El organismo se llamaba anteriormente <i>Pseudomonas cepacia</i> ^d La lipasa de <i>C. viscosum</i> es idéntica a la lipasa de <i>Burkholderia glumae</i>		

Especificidad de las lipasas

Especificidad posicional o regioselectividad

Las lipasas pueden clasificarse en dos grupos según su especificidad posicional: las lipasas pancreáticas (ej. PPL, *pig pancreatic lipase*) y fúngicas (ej. *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*) son 1,3 regioselectivas, es decir, hidrolizan (o esterifican) específicamente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, mientras que las lipasas de levaduras y bacterias no son regioselectivas o lo son débilmente para las posiciones *sn*-1 y *sn*-3. No obstante, esta distinción no es categórica, ya que las lipasas pueden ser específicas posicionalmente en mayor o menor medida (Figura 29).

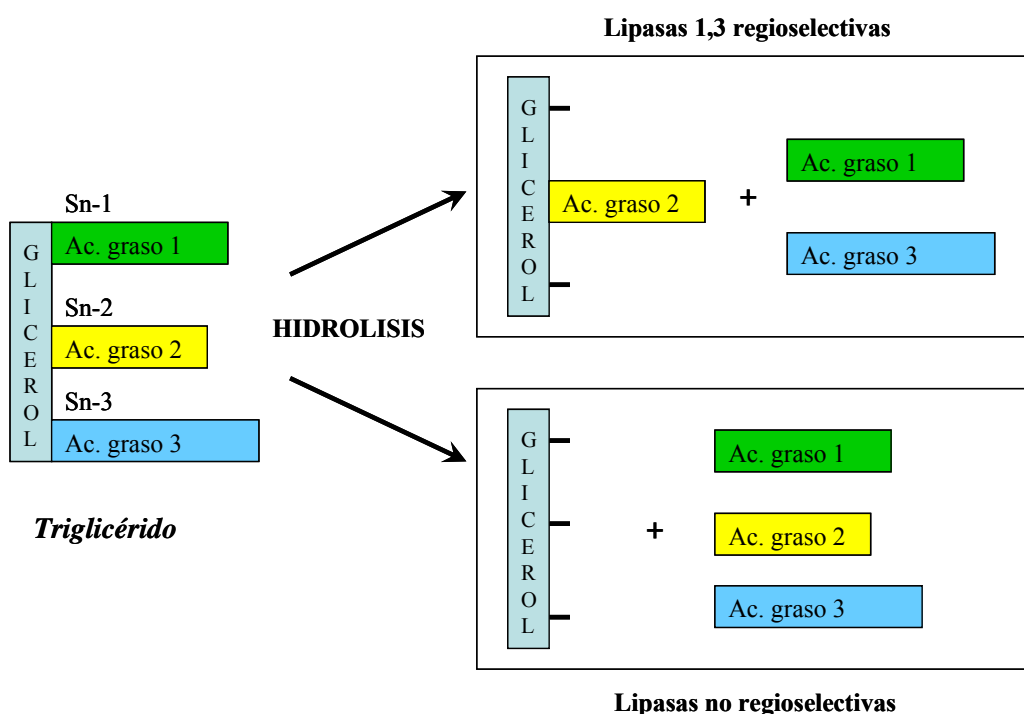


Figura 29. Especificidad posicional de las lipasas en la hidrólisis de triglicéridos.

Esta regioselectividad ofrece la posibilidad de desarrollar una variedad de estrategias para la síntesis de los diversos acilglicéridos. Se pueden sintetizar 1,2 (2,3)-diglicéridos a partir de triglicéridos por el uso de la lipasa pancreática porcina, que es 1,3-regioselectiva [525]. En cambio, algunas lipasas, por ejemplo, de cepas de *Penicillium sp.*, *P. roquefortii* [526] y otras, prefieren los triglicéridos como sustrato y exhiben claramente una inferior actividad hidrolítica frente a di-o mono-glicéridos.

Un factor que hay que tener en cuenta y que complica el estudio de esta especificidad posicional de las lipasas es la migración no enzimática de grupos acilo o acilmigración, de la posición *sn*-2 a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de mono- y diacilglicéridos. En este fenómeno se produce la formación adicional de 1,3-diglicéridos y afecta a las purzas y rendimientos de las reacciones de síntesis de glicéridos con lipasas regioselectivas. Esta migración es espontánea y aumenta bajo determinados factores como pH ácido, básico o elevada temperatura.

Especificidad por ácido graso

Las lipasas también pueden ser específicas para determinados ácidos grasos. Esta especificidad no es muy estricta y se determina comparando la diferente tasa de hidrólisis relativa de distintos ésteres de ácidos grasos con diferentes grupos acilo (Figura 30).

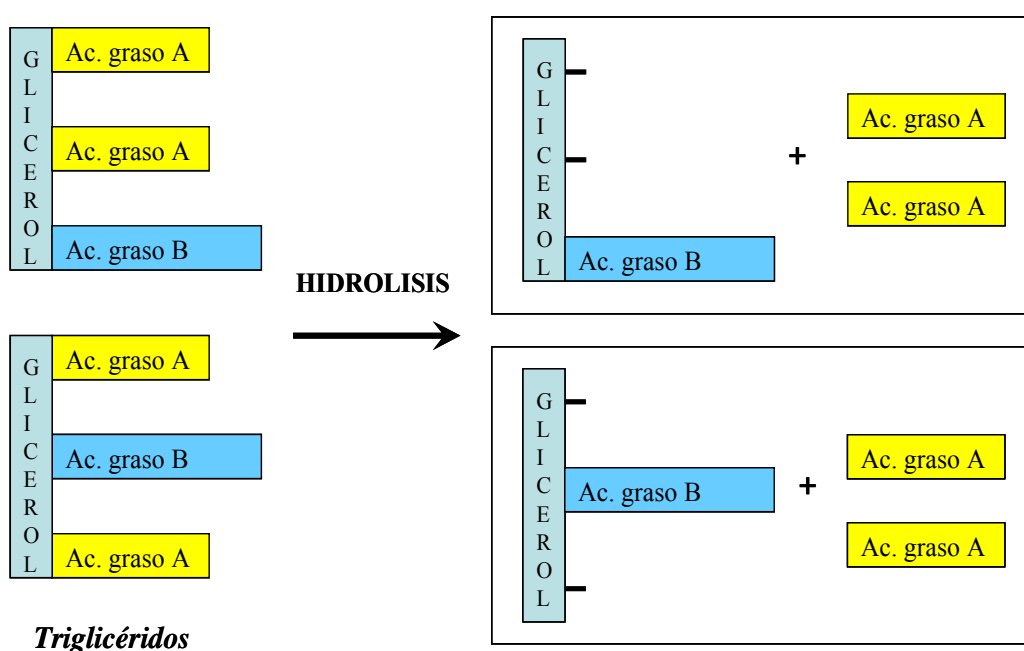


Figura 30. Especificidad por ácido graso de las lipasas. En este caso, el “ácido graso A” se hidroliza mejor que el “ácido graso B”.

Otras lipasas pueden reconocer sustratos con cierta longitud de cadena o mostrar especificidad por los dobles enlaces de ciertas posiciones de los residuos de ácidos grasos [527].

Mientras que para las lipasas inespecíficas no se han encontrado aplicaciones más amplias, aquellas con estereo- y regioselectividad son ampliamente utilizadas en la síntesis orgánica, así como en procesos industriales. Aparte de su estereoselectividad, las lipasas presentan otra serie de ventajas: el espectro de sustratos no se limita a los

triglicéridos, permanecen activas en muchos solventes hidrofóbicos, y no sólo reaccionan con el agua, también lo hacen con nucleófilos como alcoholes o aminas.

Factores que afectan a la actividad y la selectividad de las lipasas

Agua y temperatura

La catálisis enzimática en medios no acuosos ha cobrado considerable importancia en la preparación de una amplia gama de productos naturales, productos farmacéuticos, y los ingredientes alimentarios [528, 529]. En consecuencia, numerosas investigaciones han llevado a cabo para comprender mejor y definir las condiciones que conduzcan a mayores tasas de reacción en ambientes de agua baja con un mínimo de inactivación simultánea de los biocatalizadores [530] y, en última instancia, para lograr la mejora de la productividad en biorreactores industriales. En particular, los efectos del agua asociada a la enzima se han estudiado con cierto detalle. Parece que las distintas enzimas tienen requisitos muy diferentes con respecto al agua unida que necesitan para mantener un nivel apreciable de la actividad catalítica en medios no acuosos [531]. También se ha demostrado que la estabilidad de las enzimas es marcadamente mayor en condiciones de bajo contenido en agua [532, 533], por lo que es posible realizar biotransformaciones a temperaturas superiores a las convencionales utilizadas en soluciones acuosas. Además, los intentos exitosos para generar enzimas recombinantes con mayor estabilidad y actividad en disolventes no acuosos [534] sugieren que debe ser posible extender el rango de temperatura útil mediante técnicas de ingeniería genética.

Cuando las lipasas se aplican en un medio no acuoso, es importante considerar el grado de contenido de agua residual, ya que esta tiene influencia en la actividad, la termoestabilidad y la estereoselectividad [517, 518, 535].

La causa más común para la inactivación de las enzimas a temperatura elevada es la pérdida de la conformación catalíticamente competente, es decir, la termodesnaturalización. Turner y col. [532] demostraron que la temperatura a la cual una proteína sufre desnaturalización térmica (T_d) depende en gran medida de la cantidad de agua asociada a la proteína. Por ejemplo, en condiciones relativamente secas ($a_w = 0,33$) la quimotripsina y la lipasa de *Candida rugosa* se desnaturalizaron a

111 °C y 118 °C, respectivamente, mientras que en agua la desnaturalización de estas dos enzimas se produjo a 53 °C y 61 °C. Se observaron efectos similares para la lipasa de *Rhizomucor miehei*.

El medio de reacción

Generalmente, las enzimas trabajan en condiciones fisiológicas, es decir, en medio acuoso, pero algunas enzimas mantienen su actividad en otros medios. El uso de las enzimas en medios orgánicos en vez de acuosos presenta algunas ventajas [516]:

- Cambio del equilibrio termodinámico que favorece la síntesis en vez de la hidrólisis [536-538].
- Reducción de las reacciones dependientes de agua.
- Eliminación de contaminación microbiana.
- Es apropiado cuando los sustratos son insolubles y/o inestables en agua.

A su vez, las reacciones enzimáticas que tienen lugar en medios orgánicos pueden ser de dos tipos:

- Sistemas con disolventes orgánicos.
- Sistemas libres de disolventes.

Los sistemas libres de disolventes, por ejemplo una reacción que se produzca solamente a partir de sustratos líquidos (aceites) sin ningún disolvente, presentan, cuando son posibles, una serie de ventajas económicas y de ejecución frente a los sistemas con disolventes orgánicos, sobre todo a escala industrial. Es preferible no usar disolventes orgánicos desde el punto de vista de las regulaciones de seguridad que requieren los productos de grado alimentario, ya que solamente algunos disolventes son permitidos en la industria alimentaria [539], entre los cuales hexano, acetona y etanol son los más ampliamente utilizados.

Hay medios de muy diversa naturaleza en los que pueden tener lugar procesos biocatalíticos [540]. Como se describió en el apartado 3.5 titulado: “otras aplicaciones de los fluidos supercríticos”, en los últimos años han tenido un gran desarrollo los

procesos biocatalíticos en medio supercrítico. Este tipo de reacciones puede ser una alternativa ventajosa y con un enorme potencial futuro.

En el campo de los aceites y grasas se han realizado numerosos estudios que llevan a cabo reacciones catalizadas por lipasas en medio supercrítico. Se han descrito reacciones de hidrólisis de aceite de girasol empleando una lipasa de *Aspergillus niger* [541], de glicerolisis de aceite de soja [542, 543], metanolisis de *cis*-vaccénico en aceites de semillas catalizada por *Candida antarctica* [544], etc. También se han descrito reacciones de esterificación entre alcoholes y ácidos grasos en CO₂ supercrítico [545, 546].

Un problema que puede asociarse a este tipo de reacciones y sobre el que hay diversos estudios [547] es la pérdida de actividad catalítica de las lipasas en el medio supercrítico. Shishikura y col. describieron un proceso de incorporación de EPA y DHA a TGCM en CO₂ supercrítico, en el que la lipasa empleada, *Rhizomucor miehei* inmovilizada, mantenía su estabilidad después de 180 horas a 60 °C y 100 kg/cm² [548].

Aplicaciones de las lipasas

Además de las funciones biológicas en bacterias, hongos, plantas y animales, las lipasas tienen un gran interés en numerosos procesos industriales: en detergentes, alimentos, industrias del sabor, producción de fármacos, derivados de ésteres y amino ácidos, uso en química fina, agroquímicos, uso como biosensores, biorremediación, cosméticos y perfumería. [517, 518]. Además, las lipasas son las enzimas más utilizadas en la síntesis química de compuestos orgánicos, catalizan la quimio-, regio- y/o estereoselectividad de la hidrólisis de los ésteres de ácidos carboxílicos o la esterificación en disolventes orgánicos [515-518].

Lipasas en síntesis de ésteres

La aplicación principal de las lipasas en la presente Tesis es la síntesis de ésteres, concretamente de ésteres de esteroles y de ésteres etílicos de ácidos grasos.

Como ya se comentó anteriormente en la parte de la introducción dedicada a los fitoesteroles, debido a su baja solubilidad y reactividad física, uno de los métodos para crear un producto de fitoesterol más soluble, que puede darse en dosis más bajas y que mantenga una alta bio-eficiencia, es su esterificación con ácidos grasos para producir ésteres de esteroles.

Por lo general, los ésteres de esteroles, de estanol y los esteroides son preparados por esterificación química de los esteroides con los ácidos grasos correspondientes, por interesterificación con ácidos grasos metil éster, así como por su reacción con ácidos grasos halogenados o anhídridos [549]. Estos procesos químicos requieren de altas temperaturas (100-200 °C) y normalmente para la recuperación del éster de esteroles se utilizan sistemas bifásicos con disolventes orgánicos y un medio acuoso [550]. Las altas temperaturas, aunque el proceso se realice a vacío, pueden alterar la estructura de los esteroides, produciendo oxisteroides [551]. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre los posibles efectos adversos de las formas oxidadas de los esteroides [552]. En el caso de las formas oxidadas de los fitoesteroides, estudios en ratas afirman que estos compuestos son escasamente absorbidos en el intestino [553]. Mientras que algunos estudios sugieren que las formas oxidadas de los fitoesteroides podrían modular el metabolismo humano, mostrando efectos beneficiosos, otros estudios afirman que pueden tener efectos citotóxicos [554]. A pesar de que estos estudios se llevaron a cabo con dosis muy altas de oxisteroides, muy alejadas de las fisiológicas, parece lógico pensar en utilizar procesos de síntesis de ésteres de fitoesterol que minimicen la formación de estas formas oxidadas de los fitoesteroides, es decir, procesos a temperaturas moderadas como los que emplean enzimas.

Por lo general, los procedimientos para la preparación enzimática de ésteres de esteroles requieren de solventes orgánicos y tamices moleculares u otros agentes de secado [555, 556] Shimada y col. estudiaron la esterificación del colesterol, colestanol y sitosterol con ácidos grasos poliinsaturados, con un exceso molar de ácido docosahexaenoico de 3:1, usando la lipasa de *Pseudomonas* en un sistema bifásico. Obtuvieron una conversión de alrededor del 90% para la síntesis del correspondiente éster de esteroles con docosahexaenoico después de 24 h [557]. En un trabajo publicado previamente por Jonzo y col. [558] se obtuvo colesterol oleato con rendimientos satisfactorios utilizando un inmovilizado de la lipasa de *Candida rugosa* en un medio

con alto contenido de agua (alrededor del 20%) y en otro de Hedstrom y col. [559] se sintetizaron ésteres de colesterol en 72h, con un 80% de rendimiento y en un sistema de micro-emulsión.

Aunque estas estrategias presentan índices de conversión óptima para la formación de ésteres de esterol, el uso de estos sistemas multifásicos puede complicar la purificación final de los productos en el caso de las producciones de mayor escala. Esta dificultad puede evitarse cuando se trabaja con fluidos supercríticos [560]. En este sentido, King y col. obtuvieron ésteres de colesterol con ácido caprílico y palmítico, con rendimientos casi cuantitativos, usando la lipasa de *Burkholderia cepacia*. También se ha reportado [561] la síntesis enzimática con lipasas inmovilizadas de ésteres de esterol, de etanol y de esteroides mediante esterificación y transesterificación, con ácidos grasos y otros ésteres de ácidos carboxílicos, usando vacío y temperaturas moderadas. En este proceso no son necesarios ni disolventes orgánicos, ni agua, ni reactivos de secado (tales como tamices moleculares).

Lipasas y SFE

Las reacciones catalizadas por lipasas combinadas con la extracción y fraccionamiento con CO₂ supercrítico constituyen las dos principales herramientas empleadas para alcanzar los objetivos del presente trabajo. Son tecnologías que se caracterizan por su carácter no contaminante y respeto medioambiental, ofreciendo además diversas ventajas frente a otros métodos convencionales en términos de versatilidad, selectividad y eficacia, siendo viable además su implantación a escala industrial.

En la presente Tesis se pretende combinar procesos de catálisis química con procesos de extracción y fraccionamiento con CO₂ supercrítico en contracorriente para el aislamiento, purificación y enriquecimiento de lípidos funcionales, a partir de fuentes animales o vegetales. Asimismo, en algunos casos se pretende llevar a cabo procesos de catálisis enzimática, mediante lipasas, para transformar los productos lipídicos obtenidos y sintetizar ingredientes lipídicos de elevado valor añadido.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **Palou, A., Pico, C., & Bonet, M.L.**, (2004). *Food Safety and Functional Foods in the European Union: Obesity as a Paradigmatic Example for Novel Food Development*. Nutrition Reviews, 62: p. 169-181.
2. **Palou, A., Serra, F., & Pico, C.**, (2003). *General aspects on the assessment of functional foods in the European Union*. Eur J Clin Nutr, 57(S1): p. 12-17.
3. **Bellisle, F., Blundell, J.E., Dye, L., Fantino, M., Fern, E., Fletcher, R.J., Lambed, J., Roberfroid, M., Specter, S., Westenhöfer, J., & Westerterp-Plantenga, M.S.**, (1998). *Functional food science and behaviour and psychological functions*. British Journal of Nutrition, 80: p. 173-193.
4. **Palou, A. & Serra, F.**, (2000). *Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales*. Alimentación, Nutrición y Salud, 7: p. 76-90.
5. **Diplock, A.T. & Aggett, P.J.**, (1999). *Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document*. Br J Nutr, 81((Suppl. 1)): p. S1-S27.
6. **Roberfroid, M.B.**, (2000). *A European consensus of scientific concepts of functional foods*. Nutrition, 16(7-8): p. 689-691.
7. **Palou, A., Bonet, M.L., & Picó, C.**, (2002). "Study on Obesity and Functional Foods in Europe", in *The integrated system of body weight control*, D.-G.f.R.L. European Commission, Editor. p. 40-54.
8. **Chadwick, S., Henson, S., & Moseley, B.**, (2003). *Functional Foods*. Germany: Springer.
9. **Hasler, C.**, (2002). *Functional foods: Benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health*. J Nutr, (132): p. 3772-3781.
10. **Hallikainen, M.A., Sarkkinen, E.S., & Uusitupa, M.I.J.**, (2000). *Plant Stanol Esters Affect Serum Cholesterol Concentrations of Hypercholesterolemic Men and Women in a Dose-dependent Manner*. J. Nutr., 130(4): p. 767-776.
11. **Ntanios, F.Y. & Duchateau, G.S.**, (2002). *A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterolenriched spreads*. Int J Vitam Nutr Res, 72: p. 32-39.
12. **SCF**, (2000). *Opinion of the SCF on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads*. SCF/CS/NF/DOS/1 Final
13. **SCF**, (2002). *General view of the Scientific Committee on Food on the long-term effects of the intake of elevated levels of phytosterols from multiple dietary sources, with particular attention to the effects on beta-carotene*. SCF/CS/NF/DOS/20 ADD 1Final.
14. **EFSA**, (2005). *Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to two scientific publications concerning aspects of serum levels of phytosterols*. The EFSA Journal, 211: p. 1-6.
15. **Codex Alimentarius**, (1991). Second ed. Codex General Guide-lines on Claims. Vol. CAC/GL 1-1979, rev 1-1991. Geneva: WHO.
16. **EC**, (2003). *Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on nutrition and health claims made on foods*. Brussels. p. 16.7.2003 COM. 424 final 2003.
17. **CE**, (2006). *Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos*. Diario Oficial de la Unión Europea. p. 404/9-25.
18. **BOE**, (2006). *LEY 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios*. p. 46601-46611.
19. **Gunstone, F.D.**, (2003). *Lipids for functional foods and nutraceuticals*, ed. T.O.P.L. Library. Vol. 13. 322.
20. **Moreau, R.A., Whitaker, B.D., & Hicks, K.B.**, (2002). *Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses*. Progress in Lipid Research, 41(6): p. 457-500.

21. **Ostlund, R.E.**, (2002). *Phytosterols in human nutrition*. Annual Review of Nutrition, 22(1): p. 533-549.
22. **Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., & Delmer, D.**, (2002). *Sitosterol-beta -glucoside as Primer for Cellulose Synthesis in Plants*. Science, 295(5552): p. 147-150.
23. **Read, S.M. & Bacic, T.**, (2002). *PLANT BIOLOGY: Prime Time for Cellulose*. Science, 295(5552): p. 59-60.
24. **Berger, A., Jones, P., & Abumweis, S.**, (2004). *Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients*. Lipids in Health and Disease, 3(1): p. 5.
25. **Kritchevsky, D. & Chen, S.C.**, (2005). *Phytosterols--health benefits and potential concerns: a review*. Nutrition Research, 25(5): p. 413-428.
26. **Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., & Simpkins, A.H.**, (2002). *Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats*. Journal of Food Composition and Analysis, 15(2): p. 123-142.
27. **Sridevi, D. & Ishwarlal, J.**, (2006). *The Role of Dietary Supplementation with Plant Sterols and Stanols in the Prevention of Cardiovascular Disease*. Nutrition Reviews, 64(7): p. 348-354.
28. **Ostlund, R.E., Jr., Racette, S.B., Okeke, A., & Stenson, W.F.**, (2002). *Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans*. Am J Clin Nutr, 75(6): p. 1000-1004.
29. **Jonker, D., van der Hoeck, G.D., Glatz, J.F.C., Homan, C., Posthumus, M.A., & Katan, M.B.**, (1985). *Combined determination of free, esterified and glycosilated plant sterols in foods*. Nutr Rep Int, 32: p. 943-951.
30. **Clifton, P.**, (2002). *Plant sterol and stanols--comparison and contrasts. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference?* Atherosclerosis Supplements, 3(3): p. 5-9.
31. **Marangoni, F. & Poli, A.**, (2010). *Phytosterols and cardiovascular health*. Pharmacological Research, In Press, Uncorrected Proof.
32. **Verleyen, T., Sosinska, U., Ioannidou, S., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & De Greyt, W.**, (2002). *Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79(10): p. 947-953.
33. **Gillian, M.M., Susan, M.L., David, H.B., & Paul, L.**, (1995). *Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet*. Journal of Human Nutrition and Dietetics, 8(6): p. 429-440.
34. **Miettinen, T.A. & Kesaniemi, Y.A.**, (1989). *Cholesterol absorption: regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels*. Am J Clin Nutr, 49(4): p. 629-635.
35. **Nair, P.P., Turjman, N., Kessie, G., Calkins, B., Goodman, G.T., Davidovitz, H., & Nimmagadda, G.**, (1984). *Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, beta-sitosterol, and stigmasterol*. Am J Clin Nutr, 40(4): p. 927-930.
36. **Coss, J.L., Kutney, J.P., Milanova, R.K., & Jollez, P.**, (2000). *Process of purifying phytosterols from woo or plant-derived sources and compositions resulting therefrom*. Patente: WO0064921.
37. **Quílez, J., García-Lorda, P., & Salas-Salvado, J.**, (2003). *Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions*. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 22(4): p. 343-351.
38. **Fernandes, P. & Cabral, J.M.S.**, (2007). *Phytosterols: Applications and recovery methods*. Bioresource Technology, 98(12): p. 2335-2350.
39. **Chasman, D.I., Posada, D., Subrahmanyam, L., Cook, N.R., Stanton, V.P., Jr., & Ridker, P.M.**, (2004). *Pharmacogenetic Study of Statin Therapy and Cholesterol Reduction*. JAMA, 291(23): p. 2821-2827.
40. **Murray, C.J.L. & Lopez, A.D.**, (1996). *Evidence-Based Health Policy---Lessons from the Global Burden of Disease Study*. Science, 274(5288): p. 740-743.

41. **WHO**, (2009). *GLOBAL HEALTH RISKS Mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. Vol. WA 105. Geneve: WHO Press.
42. **Banegas, J.R., Villar, F., Graciani, A., & Rodríguez-Artalejo, F.**, (2006). *Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España*. Rev Esp Cardiol, 6: p. G3-12.
43. **Keaney, J.F.**, (2000). *Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction*. Molecular Aspects of Medicine, 21(4-5): p. 99-166.
44. **Mensink, R.P., Aro, A., Den Hond, E., German, J.B., Griffin, B.A., ten Meer, H.-U., Mutanen, M., Pannemans, D., & Stahl, W.**, (2003). *PASSCLAIM - Diet-related cardiovascular disease*. European Journal of Nutrition, 42(0).
45. **Ballantyne, C.M., Herd, J.A., Dunn, J.K., Jones, P.H., Farmer, J.A., & Gotto, A.M., Jr.**, (1997). *Effects of lipid lowering therapy on progression of coronary and carotid artery disease*. Current Opinion in Lipidology, 8(6): p. 354-361.
46. **Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., Macfarlane, P.W., McKillop, J.H., Packard, C.J., & The West of Scotland Coronary Prevention Study, G.**, (1995). *Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia*. N Engl J Med, 333(20): p. 1301-1308.
47. **Multiple risk factor intervention trial research group**, (1982). *Multiple risk factor intervention trial. Risk factor changes and mortality results*. JAMA, the Journal of the American Medical Association, 248: p. 1465-1477.
48. **Gotto, A.M.J., Pownall, H.J., & Havel, R.J.**, (1986). *Introduction to the plasma lipoproteins*. Methods Enzymol 128: p. 3-41.
49. **Mathews, C.K., van Holde, K.E., & Ahern, K.G.**, (2000). *Biochemistry*. San Francisco: Addison Wesley Longman, Inc.
50. **Moghadasian, M.H.**, (2000). *Pharmacological properties of plant sterols: In vivo and in vitro observations*. Life Sciences, 67(6): p. 605-615.
51. **de Jong, A., Plat, J., & Mensink, R.P.**, (2003). *Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review)*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 14(7): p. 362-369.
52. **Dawson, P.A. & Rudel, L.L.**, (1999). *Intestinal cholesterol absorption*. Current Opinion in Lipidology, 10(4): p. 315-320.
53. **Kwiterovich, P.O.**, (2000). *The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review*. The American Journal of Cardiology, 86(12, Supplement 1): p. 5-10.
54. **Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., & Mangelsdorf, D.J.**, (2002). *Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors \bar{I} and \bar{I}* . Journal of Biological Chemistry, 277(21): p. 18793-18800.
55. **Grundy, S.M.**, (1983). *Absorption and Metabolism of Dietary Cholesterol*. Annual Review of Nutrition, 3(1): p. 71-96.
56. **Ostlund, R.E., Jr., McGill, J.B., Zeng, C.-M., Covey, D.F., Stearns, J., Stenson, W.F., & Spilburg, C.A.**, (2002). *Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta 5-phytosterols and phytosteranols in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 282(4): p. E911-916.
57. **Bhattacharyya, A.K.**, (1981). *Uptake and esterification of plant sterols by rat small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 240(1): p. G50-55.
58. **Duan, L.-P., Wang, H.H., & Wang, D.Q.H.**, (2004). *Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice*. J. Lipid Res., 45(7): p. 1312-1323.
59. **Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., & Hobbs, H.H.**, (2000). *Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters*. Science, 290(5497): p. 1771-1775.
60. **Lee, M.-H., Lu, K., & Patel, S.B.**, (2001). *Genetic basis of sitosterolemia*. Current Opinion in Lipidology, 12(2): p. 141-149.

61. **Salen, G., Shefer, S., Nguyen, L., Ness, G.C., Tint, G.S., & Shore, V.,** (1992). *Sitosterolemia*. J. Lipid Res., 33(7): p. 945-955.
62. **Lutjohann, D., Bjorkhem, I., Beil, U.F., & von Bergmann, K.,** (1995). *Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment*. J. Lipid Res., 36(8): p. 1763-1773.
63. **Trautwein, E.A., Duchateau, G.S.M.J.E., Lin, Y., Mel'nikov, S.M., Molhuizen, H.O.F., & Ntanios, F.Y.,** (2003). *Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols*. European Journal of Lipid Science and Technology, 105(3-4): p. 171-185.
64. **Ostlund, R.E., Spilburg, C.A., & Stenson, W.F.,** (1999). *Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans*. Vol. 70. 826-31.
65. **Christiansen, L., Karjalainen, N., Serimaa, A., Lonnroth, N., Paakkari, T., & Yliruusi, J.,** (2001). *Phase behaviour of b-sitosterol-cholesterol and b-sitostanol-cholesterol co-precipitates*. Stp Pharma Sci, 11: p. 167-73.
66. **Mel'nikov, S.M., Seijen ten Hoorn, J.W.M., & Bertrand, B.,** (2004). *Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism?* Chemistry and Physics of Lipids, 127(1): p. 15-33.
67. **Plat, J. & Mensink, R.P.,** (2005). *Plant Stanol and Sterol Esters in the Control of Blood Cholesterol Levels: Mechanism and Safety Aspects*. The American Journal of Cardiology, 96(1, Supplement 1): p. 15-22.
68. **Mulligan, J.D., Flowers, M.T., Tebon, A., Bitgood, J.J., Wellington, C., Hayden, M.R., & Attie, A.D.,** (2003). *ABCA1 Is Essential for Efficient Basolateral Cholesterol Efflux during the Absorption of Dietary Cholesterol in Chickens*. Journal of Biological Chemistry, 278(15): p. 13356-13366.
69. **Temel, R.E., Lee, R.G., Kelley, K.L., Davis, M.A., Shah, R., Sawyer, J.K., Wilson, M.D., & Rudel, L.L.,** (2005). *Intestinal cholesterol absorption is substantially reduced in mice deficient in both ABCA1 and ACAT2*. J. Lipid Res., 46(11): p. 2423-2431.
70. **Plosch, T., Kruit, J.K., Bloks, V.W., Huijkman, N.C.A., Havinga, R., Duchateau, G.S.M.J.E., Lin, Y., & Kuipers, F.,** (2006). *Reduction of Cholesterol Absorption by Dietary Plant Sterols and Stanols in Mice Is Independent of the Abcg5/8 Transporter*. J. Nutr., 136(8): p. 2135-2140.
71. **Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J.C., & Blanco-Vaca, F.,** (2007). *Are LXR-regulated genes a major molecular target of plant sterols/stanols?* Atherosclerosis, 195(1): p. 210-211.
72. **Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J.C., & Blanco-Vaca, F.,** (2006). *Phytosterol-mediated inhibition of intestinal cholesterol absorption is independent of ATP-binding cassette transporter A1*. British Journal of Nutrition, 95(03): p. 618-622.
73. **Child, P. & Kuksis, A.,** (1983). *Critical role of ring structure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations in vitro*. J. Lipid Res., 24(9): p. 1196-1209.
74. **Temel, R.E., Gebre, A.K., Parks, J.S., & Rudel, L.L.,** (2003). *Compared with Acyl-CoA:Cholesterol O-Acyltransferase (ACAT) 1 and Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, ACAT2 Displays the Greatest Capacity to Differentiate Cholesterol from Sitosterol*. Journal of Biological Chemistry, 278(48): p. 47594-47601.
75. **Field, F.J., Born, E., & Mathur, S.N.,** (2004). *Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression*. J. Lipid Res., 45(12): p. 2252-2259.
76. **Jain, D., Ebine, N., Jia, X., Kassis, A., Marinangeli, C., Fortin, M., Beech, R., Hicks, K.B., Moreau, R.A., Kubow, S., & Jones, P.J.H.,** (2008). *Corn fiber oil and sitostanol decrease cholesterol absorption independently of intestinal sterol transporters in hamsters*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 19(4): p. 229-236.
77. **Field, F.J., Born, E., & Mathur, S.N.,** (1997). *Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells*. J. Lipid Res., 38(2): p. 348-360.
78. **Fernández, C., Suárez, Y., Ferruelo, A.J., Gómez-Coronado, D., & Lasunción, M.A.,** (2002). *Inhibition of cholesterol biosynthesis by Delta22-unsaturated*

- phytosterols via competitive inhibition of sterol Delta24-reductase in mammalian cells.* Biochem J, 366: p. 109-19.
79. **Nguyen, L.B., Salen, G., Shefer, S., Bullock, J., Chen, T., Tint, G.S., Chowdhary, I.R., & Lerner, S.,** (1994). *Deficient ileal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in sitosterolemia: Sitosterol is not a feedback inhibitor of intestinal cholesterol biosynthesis.* Metabolism, 43(7): p. 855-859.
80. **Volger, O.L., van der Boom, H., de Wit, E.C.M., van Duyvenvoorde, W., Hornstra, G., Plat, J., Havekes, L.M., Mensink, R.P., & Princen, H.M.G.,** (2001). *Dietary Plant Stanol Esters Reduce VLDL Cholesterol Secretion and Bile Saturation in Apolipoprotein E*3-Leiden Transgenic Mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21(6): p. 1046-1052.
81. **Ho, S.S. & Pal, S.,** (2005). *Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells.* Atherosclerosis, 182(1): p. 29-36.
82. **Abumweis, S.S., Barake, R., & Jones, P.J.,** (2008). *Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials.* Food Nutr Res., 52.
83. **Plat, J. & Mensink, R.P.,** (2002). *Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women.* FASEB J., 16(2): p. 258-260.
84. **Gylling, H., Puska, P., Vartiainen, E., & Miettinen, T.A.,** (1999). *Serum sterols during stanol ester feeding in a mildly hypercholesterolemic population.* J. Lipid Res., 40(4): p. 593-600.
85. **Hendricks, H.F.J., Weststrate, J.A., & van Vliet, T.,** (1999). *Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects.* Eur J Clin Nutr, 53: p. 319- 27.
86. **Brufau, G., Canela, M.A., & Rafecas, M.,** (2008). *Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties.* Nutrition Research, 28(4): p. 217-225.
87. **Howell, T.J., MacDougall, D.E., & Jones, P.J.H.,** (1998). *Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding.* J. Lipid Res., 39(4): p. 892-900.
88. **Maki, K.C., Davidson, M.H., Umporowicz, D.M., Schaefer, E.J., Dicklin, M.R., Ingram, K.A., Chen, S., McNamara, J.R., Gebhart, B.W., Ribaya-Mercado, J.D., Perrone, G., Robins, S.J., & Franke, W.C.,** (2001). *Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet.* Am J Clin Nutr, 74(1): p. 33-43.
89. **Jones, P.J., Raeini-Sarjaz, M., Ntanos, F.Y., Vanstone, C.A., Feng, J.Y., & Parsons, W.E.,** (2000). *Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters.* J. Lipid Res., 41(5): p. 697-705.
90. **Plat, J., van Onselen, E.N., van Heugten, M.M., & Mensink, R.P.,** (2000). *Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters.* Eur J Clin Nutr, 54: p. 671-7.
91. **Kiechl, S. & Willeit, J.,** (1999). *The Natural Course of Atherosclerosis : Part I: Incidence and Progression.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 19(6): p. 1484-1490.
92. **Moghadasian, M.H.,** (1999). *Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors.* Life Sciences, 65(13): p. 1329-1337.
93. **Moghadasian, M.H., McManus, B.M., Pritchard, P.H., & Frohlich, J.J.,** (1997). *"Tall Oil"-Derived Phytosterols Reduce Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(1): p. 119-126.
94. **Blair, S.N., Capuzzi, D.M., Gottlieb, S.O., Nguyen, T., Morgan, J.M., & Cater, N.B.,** (2000). *Incremental reduction of serum total cholesterol and low-density*

- lipoprotein cholesterol with the addition of plant stanol ester-containing spread to statin therapy. The American Journal of Cardiology*, 86(1): p. 46-52.
95. **Awad, A.B., Smith, A.J., & Fink, C.S.**, (2001). *Plant sterols regulate rat vascular smooth muscle cell growth and prostacyclin release in culture. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 64(6): p. 323-330.
96. **Bonetti, P.O., Lerman, L.O., & Lerman, A.**, (2003). *Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(2): p. 168-175.
97. **Raitakari, O.T., Salo, P., Gylling, H., & Miettinen, T.A.**, (2008). *Plant stanol ester consumption and arterial elasticity and endothelial function. British Journal of Nutrition*, 100(03): p. 603-608.
98. **Zawistowski, J.**, (2001). *Method of preparing microparticles of phytosterols or phytostanols. Patente: EP1148793.*
99. **Engel, R. & Schubert, H.**, (2005). *Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2): p. 233-237.
100. **Ntanios, F.Y., Homma, Y., & Ushiro, S.**, (2002). *A Spread Enriched with Plant Sterol-Esters Lowers Blood Cholesterol and Lipoproteins without Affecting Vitamins A and E in Normal and Hypercholesterolemic Japanese Men and Women. J. Nutr.*, 132(12): p. 3650-3655.
101. **Carr, T.P.**, (2005). *Compound and method for enhancing the cholesterol lowering property of plant sterol and stanol esters. Patente: WO2005/023832.*
102. **Jones, P.J.H., Ntanios, F.Y., Raeini-Sarjaz, M., & Vanstone, C.A.**, (1999). *Cholesterol-lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men. American Journal of Clinical Nutrition*, 69(6): p. 1144-1150.
103. **Vanstone, C.A., Raeini-Sarjaz, M., Parsons, W.E., & Jones, P.J.H.**, (2002). *Unesterified plant sterols and stanols lower LDL-cholesterol concentrations equivalently in hypercholesterolemic persons. Am J Clin Nutr*, 76(6): p. 1272-1278.
104. **Zawistowski, J.**, (2002). *Compositions comprising edible oils or fats and phytosterols and/or phytostanols dissolved therein. Patente: EP1227734.*
105. **Goulson, M.J., Schmelzer, W.N., Kim, C.H.P., & Shieh, W.-J.**, (2003). *Aqueous dispersible steryl ester compositions. Patente: WO03086468.*
106. **Akash, A. & Miller, M.**, (2001). *Plant sterol-emulsifier complexes. Patente: US6267963.*
107. **Zima, G.C., Oldfield, T.A., Dobbs, S.W., Cook, P.M., Kelly, C.E., Crow, M.C., & Hoyme, C.A.**, (2005). *Process for the recovery of a phytolipid composition. Patente: WO2005/026189.*
108. **Perlman, D., Hayes, K., & Pronczuk, A.**, (2003). *Prepared foods containing triglyceride-recrystallized non-esterified phytosterols. Patente: WO03043433.*
109. **Christiansen, L.I., Rantanen, J.T., Von Bonsdorff, A.K., Karjalainen, M.A., & Yliruusi, J.K.**, (2002). *A novel method of producing a microcrystalline b-sitosterol suspension in oil. European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3): p. 261-269.
110. **Spilburg, C.A.**, (2003). *Methods and formulations for enhancing the absorption and gastro-intestinal bioavailability of hydrophobic drugs. Patente: WO03094891.*
111. **Kutney, J.P. & Wessman, L.M.**, (2005). *Compositions comprising one or more policosanols and/or policosanoic acids combined with sterol and/or steroid based ascorbic acid derivatives, and uses thereof. Patente: WO2005/102357.*
112. **Abumweis, S.S., Vanstone, C.A., Ebine, N., Kassis, A., Ausman, L.M., Jones, P.J.H., & Lichtenstein, A.H.**, (2006). *Intake of a Single Morning Dose of Standard and Novel Plant Sterol Preparations for 4 Weeks Does Not Dramatically Affect Plasma Lipid Concentrations in Humans. J. Nutr.*, 136(4): p. 1012-1016.
113. **Clifton, P.M., Noakes, M., Ross, D., Fassoulakis, A., Cehun, M., & Nestel, P.**, (2004). *High dietary intake of phytosterol esters decreases carotenoids and increases plasma plant sterol levels with no additional cholesterol lowering. J. Lipid Res.*, 45(8): p. 1493-1499.

114. **Awad, A.B. & Fink, C.S.**, (2000). *Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action*. J. Nutr., 130(9): p. 2127-2130.
115. **Kennedy, A.R.**, (1995). *The Evidence for Soybean Products as Cancer Preventive Agents*. J. Nutr., 125(3_Suppl): p. 733S-743.
116. **Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., & Takahashi, M.**, (1980). *Protective Effect of Plant Sterols against Chemically Induced Colon Tumors in Rats*. Cancer Res, 40(2): p. 403-405.
117. **Awad, A.B., Chen, Y.C., Fink, C.S., & Hennessey, T.**, (1996). *beta-Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids*. Anticancer Research, 16(5A): p. 2797-804.
118. **Janezic, S.A. & Rao, A.V.**, (1992). *Dose-dependent effects of dietary phytosterol on epithelial cell proliferation of the murine colon*. Food and Chemical Toxicology, 30(7): p. 611-616.
119. **Awad, A.B., Hernández, A.Y., Fink, C.S., & Mendel, S.L.**, (1997). *Effect of dietary phytosterols on cell proliferation and protein kinase C activity in rat colonic mucosa*. Nutr Cancer, 27: p. 210-215.
120. **Normen, A.L., Brants, H.A.M., Voorrips, L.E., Andersson, H.A., van den Brandt, P.A., & Goldbohm, R.A.**, (2001). *Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer*. Am J Clin Nutr, 74(1): p. 141-148.
121. **Klippel, K.F., Hittl, D.M., & Schipp, B.**, (1997). *A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia*. German BPH-Phyto Study group. Br J Urol., 80(3): p. 427-32.
122. **Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J., & Senge, T.**, (1995). *Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia*. Beta-sitosterol Study Group. Lancet, 345: p. 1529-1532.
123. **Wilt, Macdonald, & Ishani**, (1999). *Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia*. BJU International, 83(9): p. 976-983.
124. **Child, P. & Kuksis, A.**, (1982). *Differential uptake of cholesterol and plant sterols by rat erythrocytes in vitro*. Lipids, 17(10): p. 748-754.
125. **Ratnayake, W.M.N., L'Abbe, M.R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., & Trick, K.**, (2000). *Vegetable Oils High in Phytosterols Make Erythrocytes Less Deformable and Shorten the Life Span of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats*. J. Nutr., 130(5): p. 1166-1178.
126. **Mora, M.P., Tourne-Petel, C., Charveron, M., Fabre, B., Milon, A., & Muller, I.**, (1999). *Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity*. Chemistry and Physics of Lipids, 101(2): p. 255-265.
127. **Bouic, P.J.D.**, (2001). *The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 4(6): p. 471-475.
128. **Pollak, O.J.**, (1985). *Effect of plant sterols on serum lipids and atherosclerosis*. Pharmacology & therapeutics, 31 (3): p. 177-208
129. **Shipley, R.E., Peeiffer, R.R., Marsh, M.M., & Anderson, R.C.**, (1958). *Sitosterol Feeding: Chronic Animal and Clinical Toxicology and Tissue Analysis*. Circ Res, 6(3): p. 373-382.
130. **Hepburn, P.A., Horner, S.A., & Smith, M.**, (1999). *Safety Evaluation of Phytosterol Esters. Part 2. Subchronic 90-Day Oral Toxicity Study on Phytosterol Esters-A Novel Functional Food*. Food and Chemical Toxicology, 37(5): p. 521-532.
131. **Baker, V.A., Hepburn, P.A., Kennedy, S.J., Jones, P.A., Lea, L.J., Sumpter, J.P., & Ashby, J.**, (1999). *Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays*. Food and Chemical Toxicology, 37(1): p. 13-22.
132. **Lea, L.J. & Hepburn, P.A.**, (2006). *Safety evaluation of phytosterol-esters. Part 9: Results of a European post-launch monitoring programme*. Food and Chemical Toxicology, 44(8): p. 1213-1222.

133. **Waalkens-Berendsen, D.H., Wolterbeek, A.P.M., Wijnands, M.V.W., Richold, M., & Hepburn, P.A.,** (1999). *Safety Evaluation of Phytosterol Esters. Part 3. Two-Generation Reproduction Study in Rats with Phytosterol Esters--a Novel Functional Food.* Food and Chemical Toxicology, 37(7): p. 683-696.
134. **Wolfreys, A.M. & Hepburn, P.A.,** (2002). *Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and the cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one.* Food and Chemical Toxicology, 40(4): p. 461-470.
135. **Lea, L.J., Hepburn, P.A., Wolfreys, A.M., & Baldrick, P.,** (2004). *Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides.* Food and Chemical Toxicology, 42(5): p. 771-783.
136. **Ayesh, R., Weststrate, J.A., Drewitt, P.N., & Hepburn, P.A.,** (1999). *Safety evaluation of phytosterol esters. Part 5. Faecal short-chain fatty acid and microflora content, faecal bacterial enzyme activity and serum female sex hormones in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine.* Food and Chemical Toxicology, 37(12): p. 1127-1138.
137. **Weststrate, J.A., Ayesh, R., Bauer-Plank, C., & Drewitt, P.N.,** (1999). *Safety Evaluation of Phytosterol Esters. Part 4. Faecal Concentrations of Bile Acids and Neutral Sterols in Healthy Normolipidaemic Volunteers Consuming a Controlled Diet either with or without a Phytosterol Ester-enriched Margarine.* Food and Chemical Toxicology, 37(11): p. 1063-1071.
138. **Sanders, D.J., Minter, H.J., Howes, D., & Hepburn, P.A.,** (2000). *The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat.* Food and Chemical Toxicology, 38(6): p. 485-491.
139. **Whittaker, M.H., Frankos, V.H., Wolterbeek, A.P.M., & Waalkens-Berendsen, D.H.,** (1999). *Two-Generation Reproductive Toxicity Study of Plant Stanol Esters in Rats.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 29(2): p. 196-204.
140. **Turnbull, D., Frankos, V.H., van Delft, J.H.M., & DeVogel, N.,** (1999). *Genotoxicity Evaluation of Wood-Derived and Vegetable Oil-Derived Stanol Esters.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 29(2): p. 205-210.
141. **Turnbull, D., Whittaker, M.H., Frankos, V.H., & Jonker, D.,** (1999). *13-Week Oral Toxicity Study with Stanol Esters in Rats.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 29(2): p. 216-226.
142. **Slesinski, R.S., Turnbull, D., Frankos, V.H., Wolterbeek, A.P.M., & Waalkens-Berendsen, D.H.,** (1999). *Developmental Toxicity Study of Vegetable Oil-Derived Stanol Fatty Acid Esters.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 29(2): p. 227-233.
143. **Malini, T. & Vanithakumari, G.,** (1990). *Rat toxicity studies with [beta]-sitosterol.* Journal of Ethnopharmacology, 28(2): p. 221-234.
144. **De Jong, N., Pijpers, L., Bleeker, J.K., & Ocke, M.C.,** (2004). *Potential intake of phytosterols/-stanols: results of a simulation study.* Eur J Clin Nutr, 58(6): p. 907-919.
145. **Tikkanen, M.J.,** (2005). *Plant Sterols and Stanols, in Atherosclerosis: Diet and Drugs.* p. 215-230.
146. **Weststrate, J.A. & Meijer, G.W.,** (1998). *Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects.* Eur J Clin Nutr, 52: p. 334-43.
147. **Hallikainen, M.A., Sarkkinen, E.S., & Uusitupa, M.I.J.,** (1999). *Effects of low-fat stanol ester enriched margarine on concentrations of serum carotenoids in subjects with elevated serum cholesterol concentrations.* Eur J Clin Nutr, 53(966-9).
148. **Amundsen, A.L., Ose, L., Nenseter, M.S., & Ntanios, F.Y.,** (2002). *Plant sterol ester-enriched spread lowers plasma total and LDL cholesterol in children with familial hypercholesterolemia.* Am J Clin Nutr, 76(2): p. 338-344.

149. **Law, M.**, (2000). *Plant sterol and stanol margarines and health*. BMJ, 320(7238): p. 861-864.
150. **Hallikainen, M.A. & Uusitupa, M.I.J.**, (1999). *Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects*. Am J Clin Nutr, 69(3): p. 403-410.
151. **Nestel, P., Cehun, M., Pomeroy, S., Abbey, M., & Weldon, G.**, (2001). *Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods*. European Journal of Clinical Nutrition, 55(12): p. 1084-90.
152. **Judd, J., Baer, D., Chen, S., Clevidence, B., Muesing, R., Kramer, M., & Meijer, G.**, (2002). *Plant sterol esters lower plasma lipids and most carotenoids in mildly hypercholesterolemic adults*. Lipids, 37(1): p. 33-42.
153. **Noakes, M., Clifton, P., Ntanos, F., Shrapnel, W., Record, I., & McInerney, J.**, (2002). *An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations*. Am J Clin Nutr, 75(1): p. 79-86.
154. **Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., & Paoletti, R.**, (2003). *Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels*. Mayo Clinic Proceedings, 78(8): p. 965-978.
155. **Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., & Azais-Braesco, V.**, (1996). *Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets*. J. Lipid Res., 37(2): p. 250-261.
156. **Burton, G.W. & Traber, M.G.**, (1990). *Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability*. Annual Review of Nutrition, 10: p. 357-382.
157. **Brigelius-Flohe, R. & Traber, M.G.**, (1999). *Vitamin E: function and metabolism*. FASEB J., 13(10): p. 1145-1155.
158. *USDA National Nutrient Database*. [cited www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/].
159. **Bonrath, W., Eggersdorfer, M., & Netscher, T.**, (2007). *Catalysis in the industrial preparation of vitamins and nutraceuticals*. Catalysis Today, 121(1-2): p. 45-57.
160. **Food and Nutrition Board, I.o.M.**, (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. Washington, DC: National Academy Press.
161. **Yoshida, Y., Saito, Y., Jones, L.S., & Shigeri, Y.**, (2007). *Chemical Reactivities and Physical Effects in Comparison between Tocopherols and Tocotrienols: Physiological Significance and Prospects as Antioxidants*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 104(6): p. 439-445.
162. **Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N.**, (2005). *Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 338(1): p. 668-676.
163. **Niki, E.**, (2007). *Vitamin E function*. Free Radical Biology and Medicine, 43(10): p. 1466-1467.
164. **Azzi, A.**, (2007). *Molecular mechanism of [alpha]-tocopherol action*. Free Radical Biology and Medicine, 43(1): p. 16-21.
165. **Azzi, A.**, (2004). *Non-antioxidant activities of vitamin E*. Current medicinal chemistry, 11(9): p. 1113-33.
166. **Block, G. & Langseth, L.**, (1994). *Antioxidant vitamins and disease prevention*. Food Technology, 48(7): p. 80-84.
167. **Munteanu, A. & Zingg, J.M.**, (2007). *Cellular, molecular and clinical aspects of vitamin E on atherosclerosis prevention*. Molecular Aspects of Medicine, 28(5-6): p. 538-590.
168. **Kline, K., Lawson, K.A., Yu, W., & Sanders, B.G.**, (2007). *Vitamin E and Cancer*, in *Vitamins and Hormones*. p. 435-461.
169. **Luchsinger, J.A., Noble, J.M., & Scarmeas, N.**, (2007). *Diet and Alzheimer's disease*. Current Neurology and Neuroscience Reports, 7(5): p. 366-372.
170. **Chow, V.S.F.**, (2001). *The role of antioxidants in dementia and other diseases: A review*. Hong Kong Practitioner, 23(8): p. 344-351.

171. **Das, S., Lekli, I., Das, M., Szabo, G., Varadi, J., Juhasz, B., Bak, I., Nesaretam, K., Tosaki, A., Powell, S.R., & Das, D.K.,** (2008). *Cardioprotection with palm oil tocotrienols: comparison of different isomers*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(2): p. H970-978.
172. **Nesaretam, K., Stephen, R., Dils, R., & Darbre, P.,** (1998). *Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status*. *Lipids*, 33(5): p. 461-469.
173. **Hayes, K.C., Pronczuk, A., & Liang, J.S.,** (1993). *Differences in the plasma transport and tissue concentrations of tocopherols and tocotrienols: Observations in humans and hamsters*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 202(3): p. 353-359.
174. **Parodi, P.W.,** (1999). *Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat*. *Journal of Dairy Science*, 82(6): p. 1339-1349.
175. **Pouillart, P.R.,** (1998). *Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and hemoglobinopathies*. *Life Sciences*, 63(20): p. 1739-1760.
176. **Elvevoll, E.O., Eilertsen, K.-E., Brox, J., Dragnes, B.T., Falkenberg, P., Olsen, J.O., Kirkhus, B., Lamglait, A., & Østerud, B.,** (2008). *Seafood diets: Hypolipidemic and antiatherogenic effects of taurine and n-3 fatty acids*. *Atherosclerosis*, 200(2): p. 396-402.
177. **Morisco, F., Vitaglione, P., Amoruso, D., Russo, B., Fogliano, V., & Caporaso, N.,** (2008). *Foods and liver health*. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(1-2): p. 144-150.
178. **Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., & Tew, K.D.,** (2002). *Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies*. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56(5): p. 215-222.
179. **Berquin, I.M., Edwards, I.J., & Chen, Y.Q.,** (2008). *Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids*. *Cancer Letters*, 269(2): p. 363-377.
180. **Choy, P.C., Hatch, G.M., Man, R.Y.K., & Richard, W.G.,** (1997). *Phospholipid biosynthesis in health and disease*, in *Advances in Lipobiology*. JAI. p. 47-78.
181. **Bidlack, W.R.,** (1998). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. *J Am Coll Nutr*, 17(6): p. 648-.
182. **Graciani, E.,** (2006). *Los aceites y grasas: composición y propiedades*. 1 ed. Madrid: Ediciones Madrid Vicente
183. **Michelsen, B., Lund Madsen, S., & Gotfredsen, P.,** (2001). *Guide to Functional Food Ingredients*, J. Young, Editor. Leatherhead Publishing: Surrey, England. p. 143.
184. **Letawe, Boone, & PiÉRard,** (1998). *Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones*. *Clinical & Experimental Dermatology*, 23(2): p. 56-58.
185. **Zhao, G., Etherton, T.D., Martin, K.R., Vanden Heuvel, J.P., Gillies, P.J., West, S.G., & Kris-Etherton, P.M.,** (2005). *Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3): p. 909-917.
186. **Hegsted, D.M., Ausman, L.M., Johnson, J.A., & Dallal, G.E.,** (1993). *Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data [published erratum appears in Am J Clin Nutr 1993 Aug;58(2):245]*. *Am J Clin Nutr*, 57(6): p. 875-883.
187. **Hegsted, D.M. & Kritchevsky, D.,** (1997). *Diet and serum lipid concentrations: where are we?* *Am J Clin Nutr*, 65(6): p. 1893-1896.
188. **Oomah, B.D. & Mazza, G.,** (1999). *Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops*. *Trends Food Sci. Technol.*, 10: p. 193-198.
189. **Klein, V., Chajès, V., Germain, E., Schulgen, G., Pinault, M., Malvy, D., Lefrancq, T., Fignon, A., Le Floch, O., Lhuillery, C., & Bougnoux, P.,** (2000). *Low alpha-linolenic acid content of adipose breast tissue is associated with an increased risk of breast cancer*. *European Journal of Cancer*, 36(3): p. 335-340.
190. **Attar-Bashi, N.M., Frauman, A.G., & Sinclair, A.J.,** (2004). *[alpha]-Linolenic acid and the risk of prostate cancer. What is the evidence?* *The Journal of Urology*, 171(4): p. 1402-1407.

191. **Cunnane, S.C.**, (1995). *Metabolism and function of: α -Linolenic acid in humans*, in *Flaxseed in Human Nutrition*, S.C. Cunnane and Thompson, L.U., Editors. AOCS Press, Champaign, Ill.
192. **Ziboh, V.A., Miller, C.C., & Cho, Y.**, (2000). *Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites*. *Am J Clin Nutr*, 71(1 Suppl): p. 361S-6S.
193. **DeLuca, P., Rossetti, R.G., Alavian, C., Karim, P., & Zurier, R.B.**, (1999). *Effects of gammalinolenic acid on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha secretion by stimulated human peripheral blood monocytes: studies in vitro and in vivo*. *J Investig Med*, 47(5): p. 246-50.
194. **Brzeski, M., Madhok, R., & Capell, H.A.**, (1991). *Evening primrose oil in patients with rheumatoid arthritis and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Br J Rheumatol*, 30(5): p. 370-2.
195. **Bakshi, A., Mukherjee, D., Bakshi, A., Banerji, A.K., & Das, U.N.**, (2003). *Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas*. *Nutrition*, 19(4): p. 305-9.
196. **Gillis, R.C., Daley, B.J., Enderson, B.L., & Karlstad, M.D.**, (2004). *Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell death in anti-inflammatory fatty acid-treated HL-60 cells*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 28(5): p. 308-14.
197. **Calder, P.C. & Zurier, R.B.**, (2001). *Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4(2): p. 115-21.
198. **Ziboh, V.A., Naguwa, S., Vang, K., Wineinger, J., Morrissey, B.M., Watnik, M., & Gershwin, M.E.**, (2004). *Suppression of leukotriene B4 generation by ex-vivo neutrophils isolated from asthma patients on dietary supplementation with gammalinolenic acid-containing borage oil: possible implication in asthma*. *Clin Dev Immunol*, 11(1): p. 13-21.
199. **Schubert, R., Kitz, R., Beermann, C., Rose, M.A., Baer, P.C., Zielen, S., & Boehles, H.**, (2007). *Influence of low-dose polyunsaturated fatty acids supplementation on the inflammatory response of healthy adults*. *Nutrition*, 23(10): p. 724-730.
200. **Panchaud, A., Sauty, A., Kernen, Y., Decosterd, L.A., Buclin, T., Boulat, O., Hug, C., Pilet, M., & Roulet, M.**, (2006). *Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: A randomized, crossover placebo-controlled trial*. *Clinical Nutrition*, 25(3): p. 418-427.
201. **Bang, H.O., Dyerberg, J., & Hjørne, N.**, (1976). *The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos*. *Acta Medica Scandinavica*, 200(1-6): p. 69-73.
202. **Bang, H.O., Dyerberg, J., & Sinclair, H.M.**, (1980). *The composition of the Eskimo food in north western Greenland*. *Am J Clin Nutr*, 33(12): p. 2657-2661.
203. **Daviglus, M.L., Stamler, J., Oencia, A.J., Dyer, A.R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M.K., Morris, D., & Shekelle, R.B.**, (1997). *Fish Consumption and the 30-Year Risk of Fatal Myocardial Infarction*. *N Engl J Med*, 336(15): p. 1046-1053.
204. **Dolecek, T.A.**, (1992). *Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200: p. 177-82.
205. **Siscovick, D.S., Raghunathan, T.E., King, I., Weinmann, S., Bovbjerg, V.E., Kushi, L., Cobb, L.A., Copass, M.K., Psaty, B.M., Lemaitre, R., Retzlaff, B., & Knopp, R.H.**, (2000). *Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest*. *Am J Clin Nutr*, 71(1): p. 208S-212.
206. **Hu, F.B., Bronner, L., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M., Albert, C.M., Hunter, D., & Manson, J.E.**, (2002). *Fish and Omega-3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease in Women*. *JAMA*, 287(14): p. 1815-1821.
207. **Hu, F.B., Cho, E., Rexrode, K.M., Albert, C.M., & Manson, J.E.**, (2003). *Fish and Long-Chain {omega}-3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease and Total Mortality in Diabetic Women*. *Circulation*, 107(14): p. 1852-1857.
208. **Lavie, C.J., Milani, R.V., Mehra, M.R., & Ventura, H.O.**, (2009). *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases*. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(7): p. 585-594.

209. **Harrison, N. & Abhyankar, B.**, (2005). *The mechanism of action of omega-3 fatty acids in secondary prevention post-myocardial infarction*. Curr Med Res Opin, 21: p. 95-100.
210. **Simopoulos, A.P.**, (2002). *Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases*. J Am Coll Nutr, 21(6): p. 495-505.
211. **Levant, B., Ozias, M.K., Davis, P.F., Winter, M., Russell, K.L., Carlson, S.E., Reed, G.A., & McCarson, K.E.**, (2008). *Decreased brain docosahexaenoic acid content produces neurobiological effects associated with depression: Interactions with reproductive status in female rats*. Psychoneuroendocrinology, 33(9): p. 1279-1292.
212. **Hamazaki, T. & Hamazaki, K.**, (2008). *Fish oils and aggression or hostility*. Progress in Lipid Research, 47(4): p. 221-232.
213. **Mischoulon, D. & Fava, M.**, (2000). *Docosahexanoic acid and [omega]-3 fatty acids in depression*. Psychiatric Clinics of North America, 23(4): p. 785-794.
214. **Rose, D.P. & Connolly, J.M.**, (1999). *Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents*. Pharmacology & Therapeutics, 83(3): p. 217-244.
215. **Stehr, S.N. & Heller, A.R.**, (2006). *Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery*. Clinica Chimica Acta, 373(1-2): p. 1-8.
216. **Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leong, S., Heim, T., Swyer, P.R., & Chance, G.W.**, (1980). *Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements*. Early Human Development, 4(2): p. 121-129.
217. **Carlson, S.E., Werkman, S.H., Peeples, J.M., Cooke, R.J., & Tolley, E.A.**, (1993). *Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(3): p. 1073-1077.
218. **Clandinin, M.T., Van Aerde, J.E., Merkel, K.L., Harris, C.L., Springer, M.A., Hansen, J.W., & Diersen-Schade, D.A.**, (2005). *Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid*. The Journal of Pediatrics, 146(4): p. 461-468.
219. **Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., & Yamashima, T.**, (2006). *Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction*. Neuroscience Research, 56(2): p. 159-164.
220. **Muzio, G., Trombetta, A., Maggiora, M., Martinasso, G., Vasiliou, V., Lassen, N., & Canuto, R.A.**, (2006). *Arachidonic acid suppresses growth of human lung tumor A549 cells through down-regulation of ALDH3A1 expression*. Free Radical Biology and Medicine, 40(11): p. 1929-1938.
221. **Simopoulos, A.P.**, (2002). *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 56(8): p. 365-379.
222. **Keys, A., Menotti, A., & Karvonen, M.J.**, (1986). *The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study*. Am J Epidemiol, 124: p. 903-915.
223. **Dietschy, J.M.**, (1998). *Dietary Fatty Acids and the Regulation of Plasma Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentrations* The Journal of Nutrition, 128(2): p. 444S-448S.
224. **Kris-Etherton, P.M., Pearson, T.A., Wan, Y., Hargrove, R.L., Moriarty, K., Fishell, V., & Etherton, T.D.**, (1999). *High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations*. Am J Clin Nutr 70: p. 1009-15.
225. **Parthasarathy, S., Khoo, J.C., Miller, E., Barnett, J., Witztum, J.L., & Steinberg, D.**, (1990). *Low Density Lipoprotein Rich in Oleic Acid is Protected Against Oxidative Modification: Implications for Dietary Prevention of Atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(10): p. 3894-3898.
226. **Micha, R. & Mozaffarian, D.**, (2008). *Trans fatty acids: Effects on cardiometabolic health and implications for policy*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 79(3-5): p. 147-152.

227. **Booker, C.S. & Mann, J.I.**, (2008). *Trans fatty acids and cardiovascular health: Translation of the evidence base*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 18(6): p. 448-456.
228. **Lichtenstein, A.H.**, (1998). *Trans fatty acids and blood lipid levels, Lp(a), parameters of cholesterol metabolism, and hemostatic factors*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 9(5): p. 244-248.
229. **Sundram, K., Ismail, A., Hayes, K.C., Jeyamalar, R., & Pathmanathan, R.**, (1997). *Trans (Elaidic) Fatty Acids Adversely Affect the Lipoprotein Profile Relative to Specific Saturated Fatty Acids in Humans*. J. Nutr., 127(3): p. 514S-.
230. **Mozaffarian, D.**, (2006). *Trans fatty acids - Effects on systemic inflammation and endothelial function*. Atherosclerosis Supplements, 7(2): p. 29-32.
231. **Chardigny, J.-M., Destailats, F., Malpuech-Brugere, C., Moulin, J., Bauman, D.E., Lock, A.L., Barbano, D.M., Mensink, R.P., Bezelgues, J.-B., Chaumont, P., Combe, N., Cristiani, I., Joffre, F., German, J.B., Dionisi, F., Boirie, Y., & Sebedio, J.-L.**, (2008). *Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study*. Am J Clin Nutr, 87(3): p. 558-566.
232. **Motard-Belanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P., & Lamarche, B.**, (2008). *Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 87(3): p. 593-599.
233. **Banni, S.**, (2002). *Conjugated linoleic acid metabolism*. Current Opinion in Lipidology, 13(3): p. 261-266.
234. **Kramer, J., Sehat, N., Dugan, M., Mossoba, M., Yurawecz, M., Roach, J., Eulitz, K., Aalhus, J., Schaefer, A., & Ku, Y.**, (1998). *Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography*. Lipids, 33(6): p. 549-558.
235. **Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L., & Pariza, M.W.**, (1992). *Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens*. Journal of Food Composition and Analysis, 5(3): p. 185-197.
236. **Lin, H., Boylston, D., Chang, M.J., Lueddecke, L.O., & Shultz, T.D.**, (1995). *Survey of the Conjugated Linoleic Acid Contents of Dairy Products*. J. Dairy Sci., 78(11): p. 2358-2365.
237. **Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J., & Tove, S.B.**, (1966). *Intermediates and Products of the Biohydrogenation of Linoleic Acid by Butyrivibrio fibrisolvens*. Journal of Biological Chemistry, 241(6): p. 1350-1354.
238. **Kay, J.K., Mackle, T.R., Auldist, M.J., Thomson, N.A., & Bauman, D.E.**, (2004). *Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture*. J. Dairy Sci., 87(2): p. 369-378.
239. **Corl, B.A., Barbano, D.M., Bauman, D.E., & Ip, C.**, (2003). *cis-9, trans-11 CLA Derived Endogenously from trans-11 18:1 Reduces Cancer Risk in Rats*. J. Nutr., 133(9): p. 2893-2900.
240. **Al-Madaney, M.M., Kramer, J.K.G., Deng, Z., & Vanderhoek, J.Y.**, (2003). *Effects of lipid-esterified conjugated linoleic acid isomers on platelet function: evidence for stimulation of platelet phospholipase activity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1635(2-3): p. 75-82.
241. **Li, G., Barnes, D., Butz, D., Bjorling, D., & Cook, M.E.**, (2005). *10t,12c-conjugated linoleic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase expression in vitro and in vivo*. J. Lipid Res., 46(10): p. 2134-2142.
242. **Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G.**, (2006). *Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 17(12): p. 789-810.

243. **Kelley, N.S., Hubbard, N.E., & Erickson, K.L.**, (2007). *Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer*. J. Nutr., 137(12): p. 2599-2607.
244. **Lee, K.I., Lee, H., Cho, H., & Kim, Y.**, (2005). *Role of the Conjugated Linoleic Acid in the Prevention of Cancer*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: p. 135-144.
245. **Kritchevsky, D., Tepper, S., Wright, S., Czarnecki, S., Wilson, T., & Nicolosi, R.**, (2004). *Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: Growth and regression of lesions*. Lipids, 39(7): p. 611-616.
246. **Lee, K.N., Pariza, M.W., & Ntambi, J.M.**, (1998). *Conjugated Linoleic Acid Decreases Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase mRNA Expression*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 248(3): p. 817-821.
247. **Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., & Huth, P.J.**, (1997). *Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters*. Artery, 22: p. 266-277.
248. **Kritchevsky, D.**, (2000). *Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid*. British Journal of Nutrition, 83(05): p. 459-465.
249. **McLeod, R.S., LeBlanc, A.M., Langille, M.A., Mitchell, P.L., & Currie, D.L.**, (2004). *Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism*. Am J Clin Nutr, 79(6): p. 1169S-1174.
250. **Choi, Y., Park, Y., Pariza, M.W., & Ntambi, J.M.**, (2001). *Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase Activity by the trans-10,cis-12 Isomer of Conjugated Linoleic Acid in HepG2 Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 284(3): p. 689-693.
251. **Nagao, K., Inoue, N., Wang, Y.-M., Hirata, J., Shimada, Y., Nagao, T., Matsui, T., & Yanagita, T.**, (2003). *The 10trans,12cis isomer of conjugated linoleic acid suppresses the development of hypertension in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 306(1): p. 134-138.
252. **Peterson, D.G., Matitashvili, E.A., & Bauman, D.E.**, (2004). *The Inhibitory Effect of trans-10, cis-12 CLA on Lipid Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells Involves Reduced Proteolytic Activation of the Transcription Factor SREBP-1*. J. Nutr., 134(10): p. 2523-2527.
253. **Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Cook, M.E., & Pariza, M.W.**, (1995). *Dietary conjugated linoleic acid (CLA) reduces body fat content and isomers of CLA are incorporated into phospholipid fraction*, in IFT Book of Abstract. p. 183.
254. **Park, Y. & Pariza, M.W.**, (2007). *Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA)*. Food Research International, 40(3): p. 311-323.
255. **Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R., & Beitz, D.C.**, (2002). *Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid*. Clinical Nutrition, 21(6): p. 451-459.
256. **Belury, M. & Kempa-Steczko, A.**, (1997). *Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice*. Lipids, 32(2): p. 199-204.
257. **Changhua, L., Jindong, Y., Defa, L., Lidan, Z., Shiyan, Q., & Jianjun, X.**, (2005). *Conjugated Linoleic Acid Attenuates the Production and Gene Expression of Proinflammatory Cytokines in Weaned Pigs Challenged with Lipopolysaccharide*. J. Nutr., 135(2): p. 239-244.
258. **Garcia, C., Boyce, B.F., Gilles, J., Dallas, M., & Bonewald, L.F.**, (1996). *Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo*. Journal of Bone and Mineral Research, 11(11): p. 1619-1627.
259. **Yu, Y., Correll, P.H., & Vanden Heuvel, J.P.**, (2002). *Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR[gamma]-dependent mechanism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1581(3): p. 89-99.
260. **Poirier, H.I.n., Shapiro, J.S., Kim, R.J., & Lazar, M.A.**, (2006). *Nutritional Supplementation With trans-10, cis-12 CLA Conjugated Linoleic Acid Induces Inflammation of White Adipose Tissue*. Diabetes, 55(6): p. 1634-1641.

261. **Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R.M., Jobgen, S.C., Halbur, P.G., Yoon, K.-J., O'Shea, M., Mohede, I., & Hontecillas, R.,** (2003). *Conjugated Linoleic Acid Ameliorates Viral Infectivity in a Pig Model of Virally Induced Immunosuppression*. J. Nutr., 133(10): p. 3204-3214.
262. **Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y., & Pariza, M.,** (1993). *Immune modulation by altered nutrient metabolism-nutritional control of immune-induced growth depression*. Poultry Science, 72: p. 1301-1305.
263. **Luongo, D., Bergamo, P., & Rossi, M.,** (2003). *Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jurkat T cells*. Immunology Letters, 90(2-3): p. 195-201.
264. **Whigham, L.D., Cook, E.B., Stahl, J.L., Saban, R., Bjorling, D.E., Pariza, M.W., & Cook, M.E.,** (2001). *CLA reduces antigen-induced histamine and PGE2 release from sensitized guinea pig tracheae*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 280(3): p. R908-912.
265. **Yang, M. & Cook, M.E.,** (2003). *Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production*. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), 228: p. 51-58.
266. **Banu, J., Bhattacharya, A., Rahman, M., O'Shea, M., & Fernandes, G.,** (2006). *Effects of conjugated linoleic acid and exercise on bone mass in young male Balb/C mice*. Lipids in Health and Disease, 5(1): p. 7.
267. **Berge, G.M., Ruyter, B., & Åsgård, T.,** (2004). *Conjugated linoleic acid in diets for juvenile Atlantic salmon (Salmo salar); effects on fish performance, proximate composition, fatty acid and mineral content*. Aquaculture, 237(1-4): p. 365-380.
268. **Burr, L.L., Taylor, C.G., & Weiler, H.A.,** (2006). *Dietary conjugated linoleic acid does not adversely affect bone mass in obese fa/fa or lean Zucker rats*. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), 231: p. 1602-1609.
269. **Demaree, S.R., Gilbert, C.D., Mersmann, H.J., & Smith, S.B.,** (2002). *Conjugated Linoleic Acid Differentially Modifies Fatty Acid Composition in Subcellular Fractions of Muscle and Adipose Tissue but Not Adiposity of Postweanling Pigs*. J. Nutr., 132(11): p. 3272-3279.
270. **Kelley, D.S. & Erickson, K.L.,** (2003). *Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal models: benefits vs. risks*. Lipids, 38: p. 377-386.
271. **Kelly, O. & Cashman, K.D.,** (2004). *The effect of conjugated linoleic acid on calcium absorption and bone metabolism and composition in adult ovariectomised rats*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 71(5): p. 295-301.
272. **Li, Y., Seifert, M.F., Ney, D.M., Grahn, M., Grant, A.L., Allen, K.G., & Watkins, B.A.,** (1999). *Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids*. Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 14: p. 1153-1162.
273. **Ostrowska, E., Suster, D., Muralitharan, M., Cross, R.F., Leury, B.J., Bauman, D.E., & Dunshea, F.R.,** (2003). *Conjugated linoleic acid decreases fat accretion in pigs: evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry*. British Journal of Nutrition, 89(02): p. 219-229.
274. **Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., & Pariza, M.W.,** (1999). *Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice*. Lipids 34: p. 235-241.
275. **Thiel-Cooper, R.L., Parrish, F.C., Jr., Sparks, J.C., Wiegand, B.R., & Ewan, R.C.,** (2001). *Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition*. J. Anim Sci., 79(7): p. 1821-1828.
276. **Turek, J.J., Li, Y., Schoenlein, I.A., Allen, K.G.D., & Watkins, B.A.,** (1998). *Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 9(5): p. 258-266.

277. **Weiler, H., Austin, S., Fitzpatrick-Wong, S., Nitschmann, E., Bankovic-Calic, N., Mollard, R., Aukema, H., & Ogborn, M.,** (2004). *Conjugated linoleic acid reduces parathyroid hormone in health and in polycystic kidney disease in rats*. *Am J Clin Nutr*, 79(6): p. 1186S-1189.
278. **Park, Y. & Pariza, M.W.,** (2008). *Cosupplementation of Dietary Calcium and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Improves Bone Mass in Mice*. *Journal of Food Science*, 73: p. C556-C560.
279. **Kelly, O., Cusack, S., Jewell, C., & Cashman, K.D.,** (2003). *The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats*. *British Journal of Nutrition*, 90(04): p. 743-750.
280. **Rahman, M.M., Bhattacharya, A., Banu, J., & Fernandes, G.,** (2007). *Conjugated linoleic acid protects against age-associated bone loss in C57BL/6 female mice*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(7): p. 467-474.
281. **Rahman, M.M., Bhattacharya, A., & Fernandes, G.,** (2006). *Conjugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling*. *J. Lipid Res.*, 47(8): p. 1739-1748.
282. **Ip, C., Dong, Y., Ip, M.M., Banni, S., Carta, G., Angioni, E., Murru, E., Spada, S., Melis, M.P., & Saebo, A.,** (2002). *Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention*. *Nutrition and Cancer*, 43: p. 52-58.
283. **Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S., Ramirez, R.A., & Ip, M.M.,** (2002). *Inhibition of Angiogenesis by the Cancer Chemopreventive Agent Conjugated Linoleic Acid*. *Cancer Res*, 62(15): p. 4383-4389.
284. **Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S.F., McGee, S.O., & Ip, M.M.,** (2004). *Isomers of Conjugated Linoleic Acid Differ in Their Effects on Angiogenesis and Survival of Mouse Mammary Adipose Vasculature*. *J. Nutr.*, 134(2): p. 299-307.
285. **Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J., & Pariza, M.W.,** (2000). *Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486(2-3): p. 285-292.
286. **Storkson, J.M., Park, Y., Cook, M.E., & Pariza, M.W.,** (2005). *Effects of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and cognates on apolipoprotein B secretion in HepG2 cells*. 25(4): p. 387-399.
287. **Valeille, K., Grippo, D., Blouquit, M.-F., Souidi, M., Riottot, M., Bouthegourd, J.-C., S?rougne, C., & Martin, J.-C.,** (2004). *Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by the cis-9,trans-11-octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters*. *British Journal of Nutrition*, 91(02): p. 191-199.
288. **Song, H.J., Sneddon, A.A., Barker, P.A., Bestwick, C., Choe, S.N., McClinton, S., Grant, I., Rotondo, D., Heys, S.D., & Wahle, K.W.,** (2004). *Conjugated linoleic Acid inhibits proliferation and modulates protein kinase C isoforms in human prostate cancer cells*. *Nutrition and Cancer*, 49: p. 100-108.
289. **Pariza, M.W., Park, Y., Xu, X., Ntambi, J., & Kang, K.,** (2003). *Speculation on the mechanisms of action of conjugated linoleic acid*. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol. 2, ed. J. Sebedio, Christie, W.W., and Adlof, R. AOCS Press, Champaign, IL, USA. 251-258.
290. **Clement, L., Poirier, H., Niot, I., Bocher, V., Guerre-Millo, M., Krief, S., Staels, B., & Besnard, P.,** (2002). *Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse*. *J. Lipid Res.*, 43(9): p. 1400-1409.
291. **Pariza, M.W.,** (2004). *Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid*. *Am J Clin Nutr*, 79(6): p. 1132S-1136.
292. **Poirier, H., Niot, I., Clément, L., Guerre-Millo, M., & Besnard, P.,** (2005). *Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipoatrophic syndrome in the mouse*. *Biochimie*, 87(1): p. 73-79.

293. **Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S., & Ezaki, O.,** (2000). *Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice*. *Diabetes*, 49(9): p. 1534-1542.
294. **Yanagita, T., Wang, Y.-M., Nagao, K., Ujino, Y., & Inoue, N.,** (2005). *Conjugated Linoleic Acid-Induced Fatty Liver Can Be Attenuated by Combination with Docosahexaenoic Acid in C57BL/6N Mice*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24): p. 9629-9633.
295. **O'Hagan, S. & Menzel, A.,** (2003). *A subchronic 90-day oral rat toxicity study and in vitro genotoxicity studies with a conjugated linoleic acid product*. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12): p. 1749-1760.
296. **Park, Y., Albright, K.J., & Pariza, M.W.,** (2005). *Effects of conjugated linoleic acid on long term feeding in Fischer 344 rats*. *Food and Chemical Toxicology*, 43(8): p. 1273-1279.
297. **Wargent, E., Sennitt, M.V., Stocker, C., Mayes, A.E., Brown, L., O'dowd, J., Wang, S., Einerhand, A.W., Mohede, I., Arch, J.R., & Cawthorne, M.A.,** (2005). *Prolonged treatment of genetically obese mice with conjugated linoleic acid improves glucose tolerance and lowers plasma insulin concentration: possible involvement of PPAR activation*. *Lipids in Health and Disease*. [Electronic Resource] 4, 3.
298. **Akahoshi, A., Goto, Y., Murao, K., Miyazaki, T., Yamasaki, M., Nonaka, M., Yamada, K., & Sugano, M.,** (2002). *Conjugated Linoleic Acid Reduces Body Fats and Cytokine Levels of Mice*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(4): p. 916-920.
299. **Bhattacharya, A., Rahman, M.M., Sun, D., Lawrence, R., Mejia, W., McCarter, R., O'Shea, M., & Fernandes, G.,** (2005). *The Combination of Dietary Conjugated Linoleic Acid and Treadmill Exercise Lowers Gain in Body Fat Mass and Enhances Lean Body Mass in High Fat-Fed Male Balb/C Mice*. *J. Nutr.*, 135(5): p. 1124-1130.
300. **Pariza, M.W., Park, Y., & Cook, M.E.,** (2000). *Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid: Evidence and Speculation*. *Exp. Biol. Med.*, 223(1): p. 8-13.
301. **Park, Y., Albright, K.J., Storkson, J.M., Liu, W., & Pariza, M.W.,** (2007). *Conjugated Linoleic Acid (CLA) Prevents Body Fat Accumulation and Weight Gain in an Animal Model*. *Journal of Food Science*, 72(8): p. S612-S617.
302. **Sugano, M., Akahoshi, A., Koba, K., Tanaka, K., Okumura, T., Matsuyama, H., Goto, Y., Miyazaki, T., Murao, K., Yamasaki, M., Nonaka, M., & Yamada, K.,** (2001). *Dietary manipulations of body fat-reducing potential of conjugated linoleic acid in rats*. Vol. 65. 2535-41.
303. **Chung, S., Brown, J.M., Provo, J.N., Hopkins, R., & McIntosh, M.K.,** (2005). *Conjugated Linoleic Acid Promotes Human Adipocyte Insulin Resistance through NF κ B-dependent Cytokine Production*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46): p. 38445-38456.
304. **Poirier, H., Rouault, C., Clement, L., Niot, I., Monnot, M.C., Guerre-Millo, M., & Besnard, P.,** (2005). *Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse*. *Diabetologia*, 48: p. 1059-1065.
305. **Whigham, L.D., Watras, A.C., & Schoeller, D.A.,** (2007). *Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans*. *Am J Clin Nutr*, 85(5): p. 1203-1211.
306. **Brown, J.M. & McIntosh, M.K.,** (2003). *Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity*. *J. Nutr.*, 133(10): p. 3041-3046.
307. **Terpstra, A.H.M.,** (2004). *Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature*. *Am J Clin Nutr*, 79(3): p. 352-361.
308. **Wang, Y. & Jones, P.J.H.,** (2004). *Dietary conjugated linoleic acid and body composition*. *Am J Clin Nutr*, 79(6): p. 1153S-1158.

309. **Malpuech-Brugere, C., Verboeket-van de Venne, W.P.H.G., Mensink, R.P., Arnal, M.-A., Morio, B., Brandolini, M., Saebo, A., Lassel, T.S., Chardigny, J.M., Sebedio, J.L., & Beaufrere, B., (2004).** *Effects of Two Conjugated Linoleic Acid Isomers on Body Fat Mass in Overweight Humans*[ast][ast]. *Obesity*, 12(4): p. 591-598.
310. **Pariza, M.W., Park, Y., & Cook, M.E., (2001).** *The biologically active isomers of conjugated linoleic acid.* *Progress in Lipid Research*, 40: p. 283-298.
311. **Park, Y., Yang, M., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W.E.I., Cook, M.E., & Pariza, M.W., (2007).** *Effects of conjugated linoleic acid isomers on serum tumor necrosis factor- α concentration in mice.* *Journal of Food Biochemistry*, 31: p. 252-265.
312. **Terpstra, A.H.M., (2001).** *Differences between Humans and Mice in Efficacy of the Body Fat Lowering Effect of Conjugated Linoleic Acid: Role of Metabolic Rate.* *J. Nutr.*, 131(7): p. 2067-2068.
313. **Diaz, M.L., Watkins, B.A., Li, Y., Anderson, R.A., & Campbell, W.W., (2008).** *Chromium picolinate and conjugated linoleic acid do not synergistically influence diet- and exercise-induced changes in body composition and health indexes in overweight women.* *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(1): p. 61-68.
314. **Larsen, T.M., Toubro, S., Gudmundsen, O., & Astrup, A., (2006).** *Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain.* *Am J Clin Nutr*, 83(3): p. 606-612.
315. **Whigham, L.D., O'Shea, M., Mohede, I.C.M., Walaski, H.P., & Atkinson, R.L., (2004).** *Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans.* *Food and Chemical Toxicology*, 42(10): p. 1701-1709.
316. **Kamphuis, M.M.J.W., Lejeune, M.P.G.M., Saris, W.H.M., & Westerterp-Plantenga, M.S., (2003).** *Effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on appetite and food intake in overweight subjects.* *Eur J Clin Nutr*, 57(10): p. 1268-1274.
317. **Kamphuis, M.M.J.W., Lejeune, M.P.G.M., Saris, W.H.M., & Westerterp-Plantenga, M.S., (2003).** *The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects.* *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(7): p. 840-847.
318. **Attar-Bashi, N.M., Weisinger, R.S., Begg, D.P., Li, D., & Sinclair, A.J., (2007).** *Failure of conjugated linoleic acid supplementation to enhance biosynthesis of docosahexaenoic acid from [alpha]-linolenic acid in healthy human volunteers.* *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76(3): p. 121-130.
319. **Berven, G., Bye, A., Hals, O., Blankson, H., & Gudmundsen, O., (2000).** *Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers.* *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(7): p. 455-462.
320. **Herrera, J.A., Shahabuddin, A.K.M., Ersheng, G., Wei, Y., Garcia, R.G., & López-Jaramillo, P., (2005).** *Calcium plus linoleic acid therapy for pregnancy-induced hypertension.* *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 91(3): p. 221-227.
321. **Iwata, T., Kamegai, T., Yamauchi-Sato, Y., Ogawa, A., Kasai, M., Aoyama, T., & Kondo, K., (2007).** *Safety of Dietary Conjugated Linoleic Acid (CLA) in a 12-weeks Trial in Healthy Overweight Japanese Male Volunteers.* *Journal of Oleo Science*, 56(10): p. 517-525.
322. **Herrera, J.A., Arévalo-Herrera, M., Shahabuddin, A.K.M., Ersheng, G., Herrera, S., Garcia, R.G., & López-Jaramillo, P., (2006).** *Calcium and Conjugated Linoleic Acid Reduces Pregnancy-Induced Hypertension and Decreases Intracellular Calcium in Lymphocytes.* *American Journal of Hypertension*, 19(4): p. 381-387.
323. **Benito, P., Nelson, G.J., Kelley, D.S., Bartolini, G., Schmidt, P.C., & Simon, V., (2001).** *The effect of conjugated linoleic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans.* *Lipids* 36: p. 221-227.
324. **Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E., & Aromaa, A., (1996).** *Intake of dairy products and the risk of breast cancer.* *British Journal of Cancer*, 73: p. 687-691.

325. **Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M.L., Kataja, V., & Uusitupa, M.,** (2000). *Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women.* Nutrition and Cancer, 38: p. 151-157.
326. **Chajes, V., Lavillonniere, F., Maillard, V., Giraudeau, B., Jourdan, M.L., Sebedio, J.L., & Bougnoux, P.,** (2003). *Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis.* Nutrition and Cancer, 45: p. 17-23.
327. **McCann, S.E., Ip, C., Ip, M.M., McGuire, M.K., Muti, P., Edge, S.B., Trevisan, M., & Freudenheim, J.L.,** (2004). *Dietary Intake of Conjugated Linoleic Acids and Risk of Premenopausal and Postmenopausal Breast Cancer, Western New York Exposures and Breast Cancer Study (WEB Study).* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 13(9): p. 1480-1484.
328. **Rissanen, H., Knekt, P., Jarvinen, R., Salminen, I., & Hakulinen, T.,** (2003). *Serum fatty acids and breast cancer incidence.* Nutrition and Cancer, 45: p. 168-175.
329. **Voorrips, L.E., Brants, H.A.M., Kardinaal, A.F.M., Hiddink, G.J., van den Brandt, P.A., & Goldbohm, R.A.,** (2002). *Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer.* Am J Clin Nutr, 76(4): p. 873-882.
330. **Larsson, S.C., Bergkvist, L., & Wolk, A.,** (2005). *High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort.* Am J Clin Nutr, 82(4): p. 894-900.
331. **Albers, R., van der Wielen, R.P.J., Brink, E.J., Hendriks, H.F.J., Dorovska-Taran, V.N., & Mohede, I.C.M.,** (2003). *Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men.* Eur J Clin Nutr, 57(4): p. 595-603.
332. **Song, H.J., Grant, I., Rotondo, D., Mohede, I., Sattar, N., Heys, S.D., & Wahle, K.W.J.,** (2005). *Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers.* Eur J Clin Nutr, 59(4): p. 508-517.
333. **Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Grimble, R.F., Williams, C.M., Calder, P.C., & Yaqoob, P.,** (2004). *Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans.* Am J Clin Nutr, 80(6): p. 1626-1633.
334. **Turpeinen, A.M., Yl?nen, N., von Willebrand, E., Basu, S., & Aro, A.,** (2008). *Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy.* British Journal of Nutrition, 100(01): p. 112-119.
335. **Brownbill, R.A., Petrosian, M., & Ilich, J.Z.,** (2005). *Association between Dietary Conjugated Linoleic Acid and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women.* J Am Coll Nutr, 24(3): p. 177-181.
336. **Gaullier, J.-M., Halse, J., Hoyer, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., & Gudmundsen, O.,** (2005). *Supplementation with Conjugated Linoleic Acid for 24 Months Is Well Tolerated by and Reduces Body Fat Mass in Healthy, Overweight Humans.* J. Nutr., 135(4): p. 778-784.
337. **Doyle, L., Jewell, C., Mullen, A., Nugent, A.P., Roche, H.M., & Cashman, K.D.,** (2005). *Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid on markers of calcium and bone metabolism in healthy adult men.* Eur J Clin Nutr, 59(3): p. 432-440.
338. **Gaullier, J.-M., Halse, J., Hoyer, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., & Gudmundsen, O.,** (2004). *Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans.* Am J Clin Nutr, 79(6): p. 1118-1125.
339. **Kreider, R.B., Ferreira, M.P., Greenwood, M., Wilson, M., & Almada, A.L.,** (2002). *Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers.* Journal of Strength and Conditioning Research, 16: p. 325-334.
340. **Jewell, C. & Cashman, K.D.,** (2003). *The effect of conjugated linoleic acid and medium-chain fatty acids on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells.* British Journal of Nutrition, 89(05): p. 639-647.

341. **Jewell, C., Cusack, S., & Cashman, K.D.**, (2005). *The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal-like Caco-2 cells*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 72(3): p. 163-171.
342. **Murphy, E.F., Jewell, C., Hooiveld, G.J., Muller, M., & Cashman, K.D.**, (2006). *Conjugated linoleic acid enhances transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells: An insight into molecular changes*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 74(5): p. 295-301.
343. **Roche, H.M., Terres, A.M., Black, I.B., Gibney, M.J., & Kelleher, D.**, (2001). *Fatty acids and epithelial permeability: effect of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells*. Gut, 48(6): p. 797-802.
344. **Gaullier, J.-M., Berven, G., Blankson, H., & Gudmundsen, O.**, (2002). *Clinical trial results support a preference for using CLA preparations enriched with two isomers rather than four isomers in human studies*. Lipids, 37(11): p. 1019-1025.
345. **Scimeca, J.A.**, (1998). *Toxicological Evaluation of Dietary Conjugated Linoleic Acid in Male Fischer 344 Rats*. Food and Chemical Toxicology, 36(5): p. 391-395.
346. **Allison, D.B., Egan, S.K., Barraj, L.M., Caughman, C., Infante, M., & Heimbach, J.T.**, (1999). *Estimated Intakes of Trans Fatty and Other Fatty Acids in the US Population*. Journal of the American Dietetic Association, 99(2): p. 166-174.
347. **Lock, A. & Bauman, D.**, (2004). *Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health*. Lipids, 39(12): p. 1197-1206.
348. **Adlof, R., Duval, S., & Emken, E.**, (2000). *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans*. Lipids, 35(2): p. 131-135.
349. **Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D.L., & Griinari, J.M.**, (2002). *Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans*. Am J Clin Nutr, 76(3): p. 504-510.
350. **Cruz-Hernandez, C., Kramer, J.K.G., Kennelly, J.J., Glimm, D.R., Sorensen, B.M., Okine, E.K., Goonewardene, L.A., & Weselake, R.J.**, (2007). *Evaluating the Conjugated Linoleic Acid and Trans 18:1 Isomers in Milk Fat of Dairy Cows Fed Increasing Amounts of Sunflower Oil and a Constant Level of Fish Oil*. J. Dairy Sci., 90(8): p. 3786-3801.
351. **Bauman, D.E., Baumgard, B.A., & Corl, J.M.**, (2000). *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants*. ProcAm. Soc. Anim. Sci., Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.
352. **Tholstrup, T., Raff, M., Basu, S., Nonboe, P., Sejrsen, K., & Straarup, E.M.**, (2006). *Effects of butter high in ruminant trans and monounsaturated fatty acids on lipoproteins, incorporation of fatty acids into lipid classes, plasma C-reactive protein, oxidative stress, hemostatic variables, and insulin in healthy young men*. Am J Clin Nutr, 83(2): p. 237-243.
353. **Raff, M., Tholstrup, T., Sejrsen, K., Straarup, E.M., & Wiinberg, N.**, (2006). *Diets Rich in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid Have No Effect on Blood Pressure and Isobaric Arterial Elasticity in Healthy Young Men*. J. Nutr., 136(4): p. 992-997.
354. **Bauchart, D., Roy, A., Lorenz, S., Chardigny, J.M., Ferlay, A., Gruffat, D., Chilliard, Y., & Durand, D.**, (2007). *Butters varying in trans 18:1 and cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid modify plasma lipoproteins in the hypercholesterolemic rabbit*. Lipids, 42: p. 123-33.
355. **Meijer, G.W., van Tol, A., van Berkel, T.J.C., & Weststrate, J.A.**, (2001). *Effect of dietary elaidic versus vaccenic acid on blood and liver lipids in the hamster*. Atherosclerosis, 157(1): p. 31-40.
356. **Lock, A.L., Horne, C.A.M., Bauman, D.E., & Salter, A.M.**, (2005). *Butter Naturally Enriched in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid Alters Tissue Fatty Acids and Improves the Plasma Lipoprotein Profile in Cholesterol-Fed Hamsters*. J. Nutr., 135(8): p. 1934-1939.

357. **Wang, Y., Lu, J., Ruth, M.R., Goruk, S.D., Reaney, M.J., Glimm, D.R., Vine, D.F., Field, C.J., & Proctor, S.D.,** (2008). *Trans-11 Vaccenic Acid Dietary Supplementation Induces Hypolipidemic Effects in JCR:LA-cp Rats*. J. Nutr., 138(11): p. 2117-2122.
358. **Wang, Y., Lu, J., Ruth, M.R., MacNaughton, K., Kelly, S.E., Shi, D., Goruk, S.D., Glimm, D., Reaney, M.J., Vine, D.F., Field, C.J., & Proctor, S.D.,** (2008). *Novel hypolipidemic properties of trans-11 vaccenic acid is partially due to reduced chylomicron production and improved postprandial lipaemia in the JCR:LA-cp rat*. Atherosclerosis Supplements, 9(2): p. 101-101.
359. **Jensen, R.G.,** (2002). *The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000*. J. Dairy Sci., 85(2): p. 295-350.
360. **López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Nestares, M.T., Ros, P.B., Barrionuevo, M., & Campos, M.S.,** (2005). *Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats*. Vol. 88. 1024-30.
361. **Megremis, C.J.,** (1991). *Medium chain triglycerides: a non-conventional fat*. Food Technol, 45: p. 108-114.
362. **Traul, K.A., Driedger, A., Ingle, D.L., & Nakhasi, D.,** (2000). *Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides*. Food and Chemical Toxicology, 38(1): p. 79-98.
363. **ADA reports,** (1998). *Position of The American Dietetic Association: Fat Replacers*. Journal of the American Dietetic Association, 98(4): p. 463-468.
364. **Bach, A.C., Frey, A., & Lutz, O.,** (1989). *Clinical and experimental effects of medium-chain-triglyceride-based fat Emulsions--A review*. Clinical Nutrition, 8(5): p. 223-235.
365. **Mahan, L.K. & Escote-Stump, S.,** (2001). *Nutrición y dietoterapia de Krause. Macronutrientes: carbohidratos, proteínas y lípidos.* . McGraw-Hill Interamericana. México. 33-72.
366. **Sáyago-Ayerdi, S.G., Vaquero, M.P., Schultz-Moreira, A., Bastida, S., & Sánchez-Muniz, F.J.,** (2008). *Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad*. Nutr Hosp, 23((3)): p. 191-202.
367. **Marten, B., Pfeuffer, M., & Schrezenmeir, J.,** (2006). *Medium-chain triglycerides*. International Dairy Journal, 16(11): p. 1374-1382.
368. **Aas, M.,** (1971). *Organ and subcellular distribution of fatty acid activating enzymes in the rat*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 231(1): p. 32-47.
369. **Metges, C.C. & Wolfram, G.,** (1991). *Medium and Long Chain Triglycerides Labeled with ¹³C: A Comparison of Oxidation after Oral or Parenteral Administration in Humans*. J. Nutr., 121(1): p. 31-36.
370. **Mayorek, N. & Bar-Tana, J.,** (1983). *Medium chain fatty acids as specific substrates for diglyceride acyltransferase in cultured hepatocytes*. Journal of Biological Chemistry, 258(11): p. 6789-6792.
371. **Hill, J.O., Peters, J.C., Lin, D., Yakubu, F., Greene, H., & Swift, L.,** (1993). *Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat to rats*. Int J Obes Relat Metab Disord, 17: p. 223-236.
372. **Hwang, S.G., Yano, H., & Kawashima, R.,** (1992). *The influence of dietary medium and long chain triglycerides on growth performances and fat deposition in growing rats*. J Nutr Sci Vitaminol, 38: p. 127-139.
373. **St-Onge, M.-P. & Jones, P.J.H.,** (2002). *Physiological Effects of Medium-Chain Triglycerides: Potential Agents in the Prevention of Obesity*. J. Nutr., 132(3): p. 329-332.
374. **St-Onge, M.P., Bourque, C., Jones, P.J.H., Ross, R., & Parsons, W.E.,** (2003). *Medium- versus long-chain triglycerides for 27 days increases fat oxidation and energy expenditure without resulting in changes in body composition in overweight women*. Int J Obes Relat Metab Disord, 27(1): p. 95-102.
375. **Vaquero, M.P., García-Arias, M.T., Carvajal, A., & Sánchez-Muniz, F.J.,** (2003). *Bioavailability of calcium: bone health implications, in Bioavailability of*

- Micronutrients and Minor Dietary Compounds. Metabolic and Technological Aspects*, R. Signpost, Editor. p. 95-104.
376. **Sulkers, E.J., Lafeber, H.N., Degenhart, H.J., Lindemans, J., & Sauer, P.J.J.**, (1992). *Comparison of Two Preterai Formulas With or Without Addition of Medium-Chain Triglycerides (MCTs). II: Effects on Mineral Balance*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 15(1): p. 42-47.
377. **Mineo, H., Hara, H., & Tomita, F.**, (2001). *Short-chain fatty acids enhance diffusional Ca transport in the epithelium of the rat cecum and colon*. Life Sciences, 69(5): p. 517-526.
378. **Pérez-Granados, A.M., Vaquero, M.P., & Navarro, M.P.**, (2003). *The frying process. Influence on the bioavailability of dietary minerals*, in *Bioavailability of Micronutrients and Minor Dietary Compounds. Metabolic and Technological Aspects*. Research Signpost. p. 31-41.
379. **Griessen, M., Ammann, P., Selz, L., Bartholdi, P., Arnaud, M.J., Bonjour, J.-P., & Blanchard, J.**, (1999). *Comparison of the effect of medium-chain and long-chain triacylglycerols on calcium absorption in healthy subjects*. Am J Clin Nutr, 69(6): p. 1237-1242.
380. **Campos, M.S., Alférez, M.J.M., & Nestares, T.**, (2003). *Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection*. Br J Nutr, 90: p. 61-67.
381. **Schoppen, S., Pérez-Granados, A.M., Carbajal, Á., Sarriá, B., Sánchez-Muniz, F.J., Gómez-Gerique, J.A., & Vaquero, M.P.**, (2005). *Sodium bicarbonated mineral water decreases postprandial lipaemia in postmenopausal women compared to a low mineral water*. British Journal of Nutrition, 94(04): p. 582-587.
382. **Hyson, D., Rutledge, J., & Berglund, L.**, (2003). *Postprandial lipemia and cardiovascular disease*. Current Atherosclerosis Reports, 5(6): p. 437-444.
383. **Kalogeris, T.J., Monroe, F., Demichele, S.J., & Tso, P.**, (1996). *Intestinal Synthesis and Lymphatic Secretion of Apolipoprotein A-IV Vary with Chain Length of Intestinally Infused Fatty Acids in Rats*. J. Nutr., 126(11): p. 2720-2729.
384. **Asakura, L., Lottenberg, A.M.P., Neves, M.Q.T.S., Nunes, V.S., Rocha, J.C., Passarelli, M., Nakandakare, E.R., & Quintao, E.C.R.**, (2000). *Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects*. Am J Clin Nutr, 71(3): p. 701-705.
385. **Borel, P., Tyssandier, V., Mekki, N., Grolier, P., Rochette, Y., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., & Azais-Braesco, V.**, (1998). *Chylomicron beta - Carotene and Retinyl Palmitate Responses Are Dramatically Diminished When Men Ingest beta -Carotene with Medium-Chain Rather than Long-Chain Triglycerides*. J. Nutr., 128(8): p. 1361-1367.
386. **Kasai, M., Nosaka, N., Maki, H., Negishi, S., Aoyama, T., & Nakamura, M.**, (2003). *Effect of dietary medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) on accumulation of body fat in healthy humans*. Asia Pac J Clin Nutr, 12: p. 151-160.
387. **Mekki, N., Charbonnier, M., Borel, P., Leonardi, J., Juhel, C., Portugal, H., & Lairon, D.**, (2002). *Butter Differs from Olive Oil and Sunflower Oil in Its Effects on Postprandial Lipemia and Triacylglycerol-Rich Lipoproteins after Single Mixed Meals in Healthy Young Men*. J. Nutr., 132(12): p. 3642-3649.
388. **Carvajal, O., Nakayama, M., & Kishi, T.**, (2000). *Effect of mediumchain fatty acid positional distribution in dietary triacylglycerol on lymphatic lipid transport and chylomicron composition*. Lipids, 35: p. 1345-1351.
389. **McGandy, R.B., Hegsted, D.M., & Myers, M.L.**, (1970). *Use of Semisynthetic Fats in Determining Effects of Specific Dietary Fatty Acids on Serum Lipids in Man*. Am J Clin Nutr, 23(10): p. 1288-1298.
390. **Swift, L.L., Hill, J.O., Peters, J.C., & Greene, H.L.**, (1992). *Plasma lipids and lipoproteins during 6 d of maintenance feeding with long-chain, medium-chain, and mixed-chain triglycerides*. Am J Clin Nutr, 56(5): p. 881-886.

391. **Wardlaw, G.M., Snook, J.T., Park, S., Patel, P.K., Pendley, F.C., Lee, M.S., & Jandacek, R.J.**, (1995). *Relative effects on serum lipids and apolipoproteins of a caprenin-rich diet compared with diets rich in palm oil/palm-kernel oil or butter*. Am J Clin Nutr, 61(3): p. 535-542.
392. **Grundy, S.M. & Denke, M.A.**, (1990). *Dietary influences on serum lipids and lipoproteins*. J. Lipid Res., 31(7): p. 1149-1172.
393. **Zock, P.L., De Vries, J.H.M., & Katan, M.B.**, (1994). *Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipids and lipoprotein levels in healthy women and men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 14: p. 567-575.
394. **Cater, N.B., Heller, H.J., & Denke, M.A.**, (1997). *Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans*. Am J Clin Nutr, 65(1): p. 41-45.
395. **Temme, E.H., Mensink, R.P., & Hornstra, G.**, (1997). *Effects of medium chain fatty acids (MCTFA), myristic acid, and oleic acid on serum lipoproteins in healthy subjects*. J. Lipid Res., 38(9): p. 1746-1754.
396. **Turkenkopf, I.J., Maggio, C.A., & Greenwood, M.R.C.**, (1982). *Effect of High Fat Weanling Diets Containing Either Medium-Chain Triglycerides or Long-Chain Triglycerides on the Development of Obesity in the Zucker Rat*. J. Nutr., 112(7): p. 1254-1263.
397. **Calabrese, C., Myers, S., Munson, S., Turet, P., & Birdsall, T.C.**, (1999). *A cross-over study of the effect of a single oral feeding of medium chain triglyceride oil vs Canola oil on post-ingestion plasma triglyceride levels in health men*. Altern Med Rev, 4: p. 23-28.
398. **Sato, K., Cho, Y., Tachibana, S., Chiba, T., Schneider, W.J., & Akiba, Y.**, (2005). *Impairment of VLDL Secretion by Medium-Chain Fatty Acids in Chicken Primary Hepatocytes Is Affected by the Chain Length*. J. Nutr., 135(7): p. 1636-1641.
399. **Tachibana, S., Sato, K., Cho, Y., Chiba, T., Schneider, W.J., & Akiba, Y.**, (2005). *Octanoate reduces very low-density lipoprotein secretion by decreasing the synthesis of apolipoprotein B in primary cultures of chicken hepatocytes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1737(1): p. 36-43.
400. **Xie, C., Woollett, L.A., Turley, S.D., & Dietschy, J.M.**, (2002). *Fatty acids differentially regulate hepatic cholesteryl ester formation and incorporation into lipoproteins in the liver of the mouse*. J. Lipid Res., 43(9): p. 1508-1519.
401. **Hill, J.O., Peters, J.C., Swift, L.L., Yang, D., Sharp, T., Abumrad, N., & Greene, H.L.**, (1990). *Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides*. J. Lipid Res., 31(3): p. 407-416.
402. **Tholstrup, T., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Petersen, M., Hoy, C.-E., Lund, P., & Sandstrom, B.**, (2004). *Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities*. Am J Clin Nutr, 79(4): p. 564-569.
403. **Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D.M., & Katan, M.B.**, (2003). *Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials*. Am J Clin Nutr, 77(5): p. 1146-1155.
404. **Tsai, Y.-H., Park, S., Kovacic, J., & Snook, J.**, (1999). *Mechanisms mediating lipoprotein responses to diets with medium-chain triglyceride and lauric acid*. Lipids, 34(9): p. 895-905.
405. **Krotkiewski, M.**, (2001). *Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides*. Int J Obes Relat Metab Disord, 25: p. 1393-400.
406. **Stein, D.T., Stevenson, B.E., Chester, M.W., Basit, M., Daniels, M.B., Turley, S.D., & McGarry, J.D.**, (1997). *The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation*. J Clin Invest, 100: p. 398-403.

407. **Sidossis, L.S., Stuart, C.A., Shulman, G.I., Lopaschuk, G.D., & Wolfe, R.R.,** (1996). *Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria.* The Journal of Clinical Investigation, 98(10): p. 2244-2250.
408. **Nakamura, T., Yoshihara, D., Ohmori, T., Yanai, M., & Takeshita, Y.,** (1994). *Effects of diet high in medium-chain triglyceride on plasma ketone, glucose, and insulin concentrations in enterectomized and normal rats.* J Nutr Sci Vitaminol, 40: p. 147-159.
409. **Bach, A.C., Ingenbleek, Y., & Frey, A.,** (1996). *The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy?* J. Lipid Res., 37(4): p. 708-726.
410. **Yost, T.J., Erskine, J.M., Gregg, T.S., Podlecki, D.L., Brass, E.P., & Eckel, R.H.,** (1994). *Dietary substitution of medium chain triglycerides in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus in an ambulatory setting: impact on glycemic control and insulin-mediated glucose metabolism.* J Am Coll Nutr, 13(6): p. 615-622.
411. **Geltrude, M. & Marco, C.,** (2006). *Medium-Chain, Even-Numbered Dicarboxylic Acids as Novel Energy Substrates: An Update.* Nutrition Reviews, 64(10): p. 449-456.
412. **Jambor de Sousa, U.L., Arnold, M., Langhans, W., Geary, N., & Leonhardt, M.,** (2006). *Caprylic acid infusion acts in the liver to decrease food intake in rats.* Physiology & Behavior, 87(2): p. 388-395.
413. **Noguchi, O., Takeuchi, H., Kubota, F., Tsuji, H., & Aoyama, T.,** (2002). *Larger diet-induced thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed longchain triacylglycerols.* J Nutr Sci Vitamin, 48: p. 524-529.
414. **Lei, T., Xie, W., Han, J., Corkey, B.E., Hamilton, J.A., & Guo, W.,** (2004). *Medium-Chain Fatty Acids Attenuate Agonist-Stimulated Lipolysis, Mimicking the Effects of Starvation[ast][ast].* Obesity, 12(4): p. 599-611.
415. **Beermann, C., Jelinek, J., Reinecker, T., Hauenschild, A., Boehm, G., & Klör, H.,** (2003). *Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers.* Lipids in Health and Disease, 2: p. 10.
416. **Rombeau, J., Kripke, S.A., & Settle, R.G.,** (1986). *Short-chain fatty acids : production, absorption, metabolism, and intestinal effects,* in *Dietary Fiber: Basic and Clinical Aspects*, D. Kritchevsky, Editor. Plenum Press: New York. p. 317-39.
417. **Smith, C.J. & Bryant, M.P.,** (1979). *Introduction to metabolic activities of intestinal bacteria.* Am J Clin Nutr, 32(1): p. 149-157.
418. **Wolin, M.J. & Miller, T.L.,** (1983). *Carbohydrate fermentation,* in *Human Intestinal Microflora in Health And Disease*, H. DJ, Editor. Academic Press: London. p. 147-65.
419. **Bourriaud, C., Robins, R.J., Martin, L., Kozłowski, F., Tenaillon, E., Cherbut, C., & Michel, C.,** (2005). *Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident.* Journal of Applied Microbiology, 99: p. 201-212.
420. **Cummings, J.H.,** (1984). *Colonic absorption: the importance of short chain fatty acids in man.* Scand J Gastroenterol Suppl, 93: p. 89-99.
421. **McNeil, N.I., Cummings, J.H., & James, W.P.,** (1978). *Short chain fatty acid absorption by the human large intestine.* Gut 19: p. 819-22.
422. **Roediger, W.E.,** (1980). *Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man.* Gut 21: p. 793-98.
423. **Kles, K.A. & Chang, E.B.,** (2006). *Short-Chain Fatty Acids Impact on Intestinal Adaptation, Inflammation, Carcinoma, and Failure.* Gastroenterology, 130(2, Supplement 1): p. S100-S105.
424. **Lim, A.G., Langmead, F.L., Feakins, R.M., & Rampton, D.S.,** (1999). *Diversion colitis: a trigger for ulcerative colitis in the in-stream colon?* Gut, 44(2): p. 279-282.

425. **Velazquez, O.C., Lederer, H.M., & Rombeau, J.L.**, (1997). *Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications*. Adv Exp Med Biol, 427: p. 123-34.
426. **Scheppach, W., Christl, S.U., Bartram, H.P., Richter, F., & Kasper, H.**, (1997). *Effects of short-chain fatty acids on the inflamed colonic mucosa*. Scand J Gastroenterol Suppl, 222: p. 53-57.
427. **Vernia, P., Monteleone, G., Grandinetti, G., Villotti, G., Di Giulio, E., Frieri, G., Marcheggiano, A., Pallone, F., Caprilli, R., & Torsoli, A.**, (2000). *Combined Oral Sodium Butyrate and Mesalazine Treatment Compared to Oral Mesalazine Alone in Ulcerative Colitis*. Digestive Diseases and Sciences, 45(5): p. 976-981.
428. **Vernia, P., Annese, V., Bresci, G., d'Albasio, G., D'Inc, R., Giaccari, S., Ingrosso, M., Mansi, C., Riegler, G., Valpiani, D., & Caprilli, R.**, (2003). *Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial*. European Journal of Clinical Investigation, 33: p. 244-248.
429. **Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J.A., Cuber, J.C., & PlaisanciÃ©, P.**, (2000). *Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon*. Gut, 46(2): p. 218-224.
430. **Frankel, W., Lew, J., Su, B., Bain, A., Klurfeld, D., Einhorn, E., MacDermott, R.P., & Rombeau, J.**, (1994). *Butyrate Increases Colonocyte Protein Synthesis in Ulcerative Colitis*. Journal of Surgical Research, 57(1): p. 210-214.
431. **Rodriguez-Cabezas, M.E., Galvez, J., Lorente, M.D., Concha, A., Camuesco, D., Azzouz, S., Osuna, A., Redondo, L., & Zarzuelo, A.**, (2002). *Dietary Fiber Down-Regulates Colonic Tumor Necrosis Factor {alpha} and Nitric Oxide Production in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitic Rats*. J. Nutr., 132(11): p. 3263-3271.
432. **Klampfer, L., Huang, J., Sasazuki, T., Shirasawa, S., & Augenlicht, L.**, (2003). *Inhibition of Interferon β Signaling by the Short Chain Fatty Acid Butyrate* | Montefiore Medical Center New Research Initiative Award to L.K. and the American Cancer Society Institutional Research Grant to L.K. (ACS IRG #98-274-01), UO1 CA88104 (to L.A.), and P30-13330 from NCI. Molecular Cancer Research, 1(11): p. 855-862.
433. **Steven, J.M., Gary, P.Z., Hoggatt, A.M., Carlos, L., & Faulk, W.P.**, (2005). *Short-chain fatty acids modulate gene expression for vascular endothelial cell adhesion molecules*. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 21(6): p. 740-748.
434. **Saemann, M.D., Bohmig, G.A., Osterreicher, C.H., Burtscher, H., Parolini, O., Diakos, C., Stockl, J., Horl, W.H., & Zlabinger, G.J.**, (2000). *Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production*. FASEB J., 14(15): p. 2380-2382.
435. **Böcker, U., Yezersky, O., Feick, P., Manigold, T., Panja, A., Kalina, U., Herweck, F., Rossol, S., & Singer, M.**, (2003). *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression*. International Journal of Colorectal Disease, 18(1): p. 25-32.
436. **Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., & Rogler, G.**, (2002). *Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation*. Gastroenterology, 122(7): p. 1987-2000.
437. **Smith, J.G., Yokoyama, W.H., & German, J.B.**, (1998). *Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression*. Crit Rev Food Sci, 38: p. 259-97.
438. **Archer, S., Meng, S., Wu, J., Johnson, J., Tang, R., & Hodin, R.**, (1998). *Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways*. Surgery, 124(2): p. 248-253.
439. **Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F., J., & Brummer, R.J.**, (2008). *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 27(2): p. 104-119.

440. **Basson, M.D., Turowski, G.A., Rashid, Z., Hong, F., & Madri, J.A.,** (1996). *Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate*. Digestive Diseases and Sciences, 41(10): p. 1986-1993.
441. **Hague, A. & Paraskeva, C.,** (1995). *The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines*. Eur J Cancer Prev 4: p. 359-64.
442. **Heerdt, B.G., Houston, M.A., & Augenlicht, L.H.,** (1994). *Potentiation by Specific Short-Chain Fatty Acids of Differentiation and Apoptosis in Human Colonic Carcinoma Cell Lines*. Cancer Res, 54(12): p. 3288-3294.
443. **Hinnebusch, B.F., Meng, S., Wu, J.T., Archer, S.Y., & Hodin, R.A.,** (2002). *The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation*. J. Nutr., 132(5): p. 1012-1017.
444. **Drummond, D.C., Noble, C.O., Kirpotin, D.B., Guo, Z., Scott, G.K., & Benz, C.C.,** (2005). *Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45(1): p. 495-528.
445. **Xu, W.S., Parmigiani, R.B., & Marks, P.A.,** (2007). *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action*. Oncogene, 26: p. 5541-52.
446. **Ebert, M.N., Beyer-Sehlmeyer, G., Liegibel, U.M., Kautenburger, T., Becker, T.W., & Pool-Zobel, B.L.,** (2001). *Butyrate Induces Glutathione S-Transferase in Human Colon Cells and Protects From Genetic Damage by 4-Hydroxy-2-Nonenal*. Nutrition and Cancer, 41(1): p. 156 - 164.
447. **Ebert, M.N., Klinder, A., Peters, W.H.M., Schaferhenrich, A., Sendt, W., Scheele, J., & Pool-Zobel, B.L.,** (2003). *Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate*. Carcinogenesis, 24(10): p. 1637-1644.
448. **Lupton, J.R.,** (1995). *Butyrate and colonic cytokinetics: differences between in vitro and in vivo studies*. European Journal of Cancer Prevention, 4(5): p. 373-378.
449. **Shomik, S., Jane, G.M., & Peter, R.G.,** (2006). *Does butyrate protect from colorectal cancer?* Journal of Gastroenterology and Hepatology, 21(1): p. 209-218.
450. **Roy, M.-J., Dionne, S., Marx, G., Qureshi, I., Sarma, D., Levy, E., & Seidman, E.G.,** (2010). *In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine*. Nutrition, 25(11-12): p. 1193-1201.
451. **Ada, R., Regina, Z., & Abraham, N.,** (2000). *Prodrugs of butyric acid from bench to bedside: Synthetic design, mechanisms of action, and clinical applications*. Drug Development Research, 50(3-4): p. 379-391.
452. **Blank-Porat, D., Gruss-Fischer, T., Tarasenko, N., Malik, Z., Nudelman, A., & Rephaeli, A.,** (2007). *The anticancer prodrugs of butyric acid AN-7 and AN-9, possess antiangiogenic properties*. Cancer Letters, 256(1): p. 39-48.
453. **Ugazio, E., Marengo, E., Pellizzaro, C., Coradini, D., Peira, E., Daidone, M.G., & Gasco, M.R.,** (2001). *The effect of formulation and concentration of cholesteryl butyrate solid lipid nanospheres (SLN) on NIH-H460 cell proliferation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 52(2): p. 197-202.
454. **Hassig, C.A., Tong, J.K., & Schreiber, S.L.,** (1997). *Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer*. Chemistry & Biology, 4(11): p. 783-789.
455. **Vidyasagar, S. & Ramakrishna, B.S.,** (2002). *Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon*. The Journal of Physiology, 539(1): p. 163-173.
456. **Hawthorne, S.B., Langenfeld, J.J., Miller, D.J., & Burford, M.D.,** (1992). *Comparison of supercritical chlorodifluoromethane, nitrous oxide, and carbon dioxide for the extraction of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons*. Analytical Chemistry, 64(14): p. 1614-1622.
457. **King, M.B. & Catchpole, O.J.,** (1993). *Physico-chemical data required for the design of near-critical fluid extraction process*, in *Extraction of natural products using near-critical solvents*, M.B.K.y.T.R. Bott, Editor. Blackie Academic & Profesional: Glasgow, UK.

458. **Reglero, G., Señoráns, F.J., & Ibáñez, E.**, (2005). *Supercritical Fluid Extraction: An Alternative to Isolating Natural Food Preservatives*, in *Novel Food Processing Technologies*, G.V. Barbosa-Cánovas, Editor. CRC Press: Boca Ratón, FL, USA. p. 539-553.
459. **Pasquali, I. & Bettini, R.**, (2008). *Are pharmaceuticals really going supercritical?* International Journal of Pharmaceutics, 364(2): p. 176-187.
460. **Brunner, G.**, (2005). *Supercritical fluids: technology and application to food processing*. Journal of Food Engineering, 67(1-2): p. 21-33.
461. **Ibanez, E., Oca, A., de Murga, G., Lopez-Sebastian, S., Tabera, J., & Reglero, G.**, (1999). *Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(4): p. 1400-1404.
462. **Carvalho, J.R.N., Moura, L.S., Rosa, P.T.V., & Meireles, M.A.A.**, (2005). *Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity*. The Journal of Supercritical Fluids, 35(3): p. 197-204.
463. **Zeković, Z., Lepojević, Ž., & Vujić, D.**, (2000). *Supercritical extraction of thyme (Thymus vulgaris L.)*. Chromatographia, 51(3): p. 175-179.
464. **Cadoni, E., Rita De Giorgi, M., Medda, E., & Poma, G.**, (1999). *Supercritical CO₂ extraction of lycopene and [beta]-carotene from ripe tomatoes*. Dyes and Pigments, 44(1): p. 27-32.
465. **Reverchon, E.**, (1997). *Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products*. The Journal of Supercritical Fluids, 10(1): p. 1-37.
466. **William, K.M., Dulcie, A.M., & Mark, W.R.**, (1996). *Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products*. Phytochemical Analysis, 7(1): p. 1-15.
467. **Langezaal, C.R., A., C., Katsiotis, S.T., Scheffer, J.J.C., & De Haan, A.B.**, (1990). *Analysis of supercritical carbon dioxide extracts from cones and leaves of a Humulus lupulus L cultivar*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 53(4): p. 455-463.
468. **Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T.**, (1995). *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidative Components from Tamarind (Tamarindus indica L.) Seed Coat*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(11): p. 2803-2806.
469. **Cavero, S., García-Risco, M.R., Marín, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Reglero, G., & Ibáñez, E.**, (2006). *Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays*. The Journal of Supercritical Fluids, 38(1): p. 62-69.
470. **Senorans, F.J., Ruiz-Rodriguez, A., Ibanez, E., Tabera, J., & Reglero, G.**, (2001). *Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Alcoholic Beverages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(4): p. 1895-1899.
471. **Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S., & Niemann, L.**, (1998). *Moisture content and particle size of dehydrated egg yolk affect lipid and cholesterol extraction using supercritical carbon dioxide*. Poult Sci, 77(11): p. 1718-1722.
472. **Chao, R.R., Mulvaney, S.J., & Bailey, M.E.**, (1991). *Supercritical CO₂ Conditions Affecting Extraction of Lipid and Cholesterol from Ground Beef*. Journal of Food Science, 56(1): p. 183-187.
473. **Merkle, J.A. & Larick, D.K.**, (1995). *Fatty Acid Content of Supercritical Carbon Dioxide Extracted Fractions of Beef Fat*. Journal of Food Science, 60(5): p. 959-962.
474. **Kazlas, P.T., Novak, R.D., & Robey, R.J.**, (1994). *Supercritical carbon dioxide decaffeination of acidified coffee*. Patente: US Patent 5 288 511.
475. **Içen, H. & Gürü, M.**, (2009). *Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids, 50(3): p. 225-228.
476. **Sharma, A.K., Prokopczyk, B., & Hoffmann, D.**, (1991). *Supercritical fluid extraction of moist snuff*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(3): p. 508-510.

477. **Ginty, P.J., Whitaker, M.J., Shakesheff, K.M., & Howdle, S.M.**, (2005). *Drug delivery goes supercritical*. *Materials Today*, 8(8, Supplement 1): p. 42-48.
478. **Cinquemani, C., Boyle, C., Bach, E., & Schollmeyer, E.**, (2007). *Inactivation of microbes using compressed carbon dioxide--An environmentally sound disinfection process for medical fabrics*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 42(3): p. 392-397.
479. **Duarte, A.R.C., Casimiro, T., Aguiar-Ricardo, A., Simplicio, A.L., & Duarte, C.M.M.**, (2006). *Supercritical fluid polymerisation and impregnation of molecularly imprinted polymers for drug delivery*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 39(1): p. 102-106.
480. **Ribeiro Dos Santos, I., Richard, J., Pech, B., Thies, C., & Benoit, J.P.**, (2002). *Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process*. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2): p. 69-78.
481. **Campbell, R.M. & Lee, M.L.**, (1986). *Supercritical fluid fractionation of petroleum- and coal-derived mixtures*. *Analytical Chemistry*, 58(11): p. 2247-2251.
482. **Ling, Y.C., Teng, H.C., & Cartwright, C.**, (1999). *Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in Chinese herbal medicine*. *Journal of Chromatography A*, 835(1-2): p. 145-157.
483. **Lehotay, S.J.**, (1997). *Supercritical fluid extraction of pesticides in foods*. *Journal of Chromatography A*, 785(1-2): p. 289-312.
484. **Reverchon, E., Poletto, M., Osséo, L., & Somma, M.**, (2000). *Hexane elimination from soybean oil by continuous packed tower processing with supercritical CO₂*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(1): p. 9-14.
485. **van der Kraan, M., Fernandez Cid, M.V., Woerlee, G.F., Veugelers, W.J.T., & Witkamp, G.J.**, (2007). *Dyeing of natural and synthetic textiles in supercritical carbon dioxide with disperse reactive dyes*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40(3): p. 470-476.
486. **Chester, T.L. & Pinkston, J.D.**, (2004). *Supercritical Fluid and Unified Chromatography*. *Analytical Chemistry*, 76(16): p. 4606-4613.
487. **Coleman, K., Boutant, R., & Verillon, F.**, (1999). *Practical aspects of preparative supercritical fluid chromatography*. UK: Gordon & Breach Science Publishers.
488. **Salvador, A., Jaime, M., Becerra, G., & Guardia, M.D.L.**, (1996). *Supercritical fluid chromatography in drug analysis: a literature survey*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 356(2): p. 109-122.
489. **Leitner, W.**, (1999). *Reactions in Supercritical Carbon Dioxide (scCO₂)*, in *Modern Solvents in Organic Synthesis*. p. 107-132.
490. **Michor, H., Marr, R., Gamse, T., Schilling, T., Klingsbichel, E., & Schwab, H.**, (1996). *Enzymatic catalysis in supercritical carbon dioxide: Comparison of different lipases and a novel esterase*. *Biotechnology Letters*, 18(1): p. 79-84.
491. **Tomoko, M., Tadao, H., & Kaoru, N.**, (2005). *Organic Synthesis Using Enzymes in Supercritical Carbon Dioxide*. *ChemInform*, 36(41).
492. **Kusdiana, D. & Saka, S.**, (2001). *Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol*. *Fuel*, 80(5): p. 693-698.
493. **He, H., Wang, T., & Zhu, S.**, (2007). *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process*. *Fuel*, 86(3): p. 442-447.
494. **Moreno-Castilla, C. & Maldonado-Hodar, F.J.**, (2005). *Carbon aerogels for catalysis applications: An overview*. *Carbon*, 43(3): p. 455-465.
495. **Maury, S., Buisson, P., Perrard, A., & Pierre, A.C.**, (2004). *Influence of the sol-gel chemistry on the activity of a lipase encapsulated in a silica aerogel*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29(1): p. 133-148.
496. **Berry, D.**, (2000). *New food solutions from extrusion*. *Prepared Foods*, 169: p. 67-72.
497. **Ranjit, T. & Ram, B.G.**, (2006). *Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process*. *International Journal of Pharmaceutics*, 308(1): p. 190-199.

498. **Catchpole, O.J., Grey, J.B., Mitchell, K.A., & Lan, J.S.,** (2004). *Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture*. The Journal of Supercritical Fluids, 29(1): p. 97-106.
499. **Ozge Guney, A.A.,** (2002). *Synthesis of controlled-release products in supercritical medium*. AIChE Journal, 48(4): p. 856-866.
500. **Wang, Y., Pfeffer, R., Dave, R., & New Jersey Institute Of, T.,** (2004). *Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical antisolvent process*. United States. Patente.
501. **Wang, Y., Wang, Y., Yang, J., Pfeffer, R., Dave, R., & Michniak, B.,** (2006). *The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery*. Powder Technology, 164(2): p. 94-102.
502. **Grunwald, P.,** (2009). *Biocatalysis. Biochemical fundamentals and applications*. London: Imperial College Press.
503. **Patel, R.N.,** (2002). *Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals*. Enzyme and Microbial Technology, 31(6): p. 804-826.
504. **Rozzell, J.D.,** (1999). *Commercial scale biocatalysis: myths and realities*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 7(10): p. 2253-2261.
505. **Straathof, A.J.J., Panke, S., & Schmid, A.,** (2002). *The production of fine chemicals by biotransformations*. Current Opinion in Biotechnology, 13(6): p. 548-556.
506. **Roberts, S.M., Casy, G., Nielsen, M.B., Phythian, S., Todd, C., & Wiggins, K.,** (1999). *Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis*. Wiley, New York.
507. **Price, N.C. & Stevens, L.,** (1999). *Fundamentals of Enzymology*: Oxford University Press.
508. **Jaeger, K.E. & Eggert, T.,** (2004). *Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution*. Current Opinion in Biotechnology, 15(4): p. 305-313.
509. **Food & Drug Administration,** (1992). *FDA's statement for the development of new stereoisomeric drugs*. Chirality, 4: p. 338-340.
510. **Bommarius, A.S. & Riebel, B.R.,** (2004). *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
511. **Anastas, P.T. & Warner, J.C.,** (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York: Oxford University Press.
512. **Plou, F.J. & Ballesteros, A.,** (1999). *Stability and stabilization of biocatalysts*. Trends in Biotechnology, 17(8): p. 304-306.
513. **Polaina, J. & MacCabe, A.P.,** (2007). *Industrial Enzymes. Structure, Function an Applications*, ed. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
514. **Panke, S. & Wubbolts, M.G.,** (2002). *Enzyme technology and bioprocess engineering*. Current Opinion in Biotechnology, 13(2): p. 111-116.
515. **Koeller, K.M. & Wong, C.H.,** (2001). *Enzymes for chemical synthesis*. Nature, 409(6817): p. 232-240.
516. **Klibanov, A.M.,** (2001). *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature, 409(6817): p. 241-246.
517. **Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., & Haas, M.J.,** (2000). *Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches*. Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic, 9(4-6): p. 113-148.
518. **Schmid, R.D. & Verger, R.,** (1998). *Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications*. Angewandte Chemie - International Edition, 37(12): p. 1609-1633.
519. **Cygler, M. & Schrag, J.D.,** (1999). *Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1441(2-3): p. 205-214.
520. **Rubin, B. & Dennis, E.A.,** (1997). *Methods in Enzymology: Lipases, Part A: Biotechnology*. Vol. 284: Academic Press.
521. **Rubin, B. & Dennis, E.A.,** (1997). *Methods in Enzymology: Lipases, Part B: Enzyme Characterization and Utilization*. Vol. 286: Academic Press

522. **Woolley, P. & Petersen, S.B.**, (1994). *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*: Cambridge University Press.
523. **Hou, C.T. & Shaw, J.**, (2007). *Biocatalysis and biotechnology for functional foods and industrial products*: CRC press.
524. **Jaeger, K.-E. & Reetz, M.T.**, (1998). *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. Trends in Biotechnology, 16(9): p. 396-403.
525. **Plou, F.J., Barandiaran, M., Calvo, M.V., Ballesteros, A., & Pastor, E.**, (1996). *High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein*. Enzyme and Microbial Technology, 18: p. 66-71.
526. **Fureby, A.M., Tian, L., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B.**, (1997). *Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides*. Enzyme and Microbial Technology, 20: p. 198-206.
527. **Dicks, R. & Bosley, J.**, (2000). *Enzymes in Lipid Modification*, ed. U.T. Bornscheuer. Weinheim: WILEY-VCH.
528. **Vulfson, E.N.**, (1993). *Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media*. Trends in Food Science & Technology, 4(7): p. 209-215.
529. **Wong, C.H. & Whitesides, G.M.**, (1994). *Enzymes in synthetic organic chemistry*. Tetrahedron Organic Chemistry Series. Vol. 12: Oxford.
530. **Halling, P.J.**, (1994). *Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis*. Enzyme and Microbial Technology, 16(3): p. 178-206.
531. **Halling, P.**, (1992). *Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media*. Biotechnology Techniques, 6(3): p. 271-276.
532. **Turner, N.A., Duchateau, D.B., & Vulfson, E.N.**, (1995). *Effect of hydration on thermostability*. Biotechnology Letters, 17(4): p. 371-376.
533. **Volkin, D.B., Staubli, A., Langer, R., & Klibanov, A.M.**, (1991). *Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 37(9): p. 843-853.
534. **Arnold, F.H.**, (1990). *Engineering enzymes for non-aqueous solvents*. Trends in Biotechnology, 8: p. 244-249.
535. **Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., & Reetz, M.T.**, (1999). *Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases*. Annual Review of Microbiology, 53(1): p. 315-351.
536. **Kim, M.S.M. & Rhee, J.S.**, (1991). *Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 68(7): p. 499-503.
537. **Klibanov, A.M.**, (1986). *Enzyme work in organic solvents* Chemtechnology, 16: p. 354.
538. **Zaks, A. & Klibanov, A.M.**, (1988). *Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents*. J. Biol. Chem., 263(7): p. 3194-3201.
539. **REAL DECRETO 472/1990 DE 6 DE ABRIL. POR EL QUE SE REGULAN LOS DISOLVENTES DE EXTRACCION UTILIZADOS EN LA ELABORACION DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS Y SUS INGREDIENTES**. BOE n. 88 de 12/4/1990
540. **Hari Krishna, S.**, (2002). *Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media*. Biotechnology Advances, 20(3-4): p. 239-267.
541. **Primožič, M., Habulin, M., & Knez, Ž.**, (2005). *Modeling of kinetics for the enzymatic hydrolysis of sunflower oil in a high-pressure reactor*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 82(8): p. 543-547.
542. **Jackson, M. & King, J.**, (1997). *Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74(2): p. 103-106.
543. **Moquin, P., Temelli, F., King, J., & Palcic, M.**, (2005). *Kinetic modeling of the glycerolysis reaction for soybean oils in supercritical carbon dioxide media*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 82(8): p. 613-617.
544. **Turner, C. & McKeon, T.**, (2002). *The use of immobilized Candida antarctica lipase for simultaneous supercritical fluid extraction and in-situ methanolysis of cis-vaccenic*

- acid in milkweed seeds*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79(5): p. 473-478.
545. **Knez, Ž., Rižner, V., Habulin, M., & Bauman, D.**, (1995). *Enzymatic synthesis of oleyl oleate in dense fluids*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72(11): p. 1345-1349.
546. **Nakaya, H., Nakamura, K., & Miyawaki, O.**, (2002). *Lipase-catalyzed esterification of stearic acid with ethanol, and hydrolysis of ethyl stearate, near the critical point in supercritical carbon dioxide*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79(1): p. 23-27.
547. **Frykman, H., Snyder, J., & King, J.**, (1998). *Screening catalytic lipase activities with an analytical supercritical fluid extractor*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75(4): p. 517-520.
548. **Shishikura, A., Fujimoto, K., Suzuki, T., & Arai, K.**, (1994). *Improved lipase-catalyzed incorporation of long-chain fatty acids into medium-chain triglycerides assisted by supercritical carbon dioxide extraction*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71(9): p. 961-967.
549. **Spener, F.**, (1979). *Preparation of common and unusual waxes*. Chemistry and Physics of Lipids, 24(4): p. 431-448.
550. **Higgins, I. & John, D.**, (1999). *Preparation of sterol and stanol-esters*. United States P. Ft. Washington. United States Patente: 5892068.
551. **Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.-M., & Piironen, V.**, (2004). *Effects of Sterol Structure, Temperature, and Lipid Medium on Phytosterol Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(21): p. 6485-6491.
552. **Dutta, P.C., Przybylski, R., & Eskin, M.**, (2006). *Formation, analysis and health effects of oxidized sterols in frying fat*, in *Deep frying: chemistry, nutrition and practical applications*, M.D. Erickson, Editor. AOCS Press: Urbana, IL. p. 111-164.
553. **Grandgirard, A., Sergiel, J.-P., Nour, M., Demaison-Meloche, J., & Gihès, C.**, (1999). *Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats*. Lipids, 34(6): p. 563-570.
554. **Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., & Trautwein, E.A.**, (2008). *Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge*. Progress in Lipid Research, 47(1): p. 37-49.
555. **Villeneuve, P., Turon, F., Caro, Y., Escoffier, R., Baréa, B., Barouh, B., Lago, R., Piombo, G., & Pina, M.**, (2005). *Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents*. Enzyme and Microbial Technology, 37(1): p. 150-155.
556. **Haraldsson, G.**, (1992). *The application of lipases in organic synthesis*. The chemistry of acid derivatives, ed. P. S. Vol. 2: John Wiley.
557. **Shimada, Y., Hirota, Y., Baba, T., Sugihara, A., Moriyama, S., Tominaga, Y., & Terai, T.**, (1999). *Enzymatic synthesis of sterol esters of polyunsaturated fatty acids*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 76(6): p. 713-716.
558. **Jonzo, M.D., Hiol, A., Druet, D., & Comeau, L.C.**, (1997). *Application of Immobilized Lipase from *Candida rugosa* to Synthesis of Cholesterol Oleate*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 69(4): p. 463-469.
559. **Hedström, G., Slotte, J.P., Backlund, M., Molander, O., & Rosenholm, J.B.**, (1992). *Lipase-Catalyzed Synthesis and Hydrolysis of Cholesterol Oleate in Aot/Isooctane Microemulsions*. Biocatalysis and Biotransformation, 6(4): p. 281 - 290.
560. **King, J., Snyder, J., Frykman, H., & Neese, A.**, (2001). *Sterol ester production using lipase-catalyzed reactions in supercritical carbon dioxide*. European Food Research and Technology, 212(5): p. 566-569.
561. **Weber, N., Weitkamp, P., & Mukherjee, K.D.**, (2001). *Fatty acid sterol, stanol, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1): p. 67-71.

Capítulo II: Procedimiento enzimático en dos etapas para la obtención de ésteres de esterol, tocoferoles y los ésteres etílicos de ácidos grasos de destilados de desodorización de aceite de soja

1.	INTRODUCCIÓN	157
1.1.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	158
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	160
2.1.	MUESTRAS Y REACTIVOS	160
2.2.	ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROLES DEL DDSMO	161
2.3.	REACCIÓN DE ETIL ESTERIFICACIÓN	161
2.4.	PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN SUPERCRTICA	161
2.5.	METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN	164
2.6.	ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS LIPÍDICAS DE PARTIDA, PRODUCTOS DE REACCIÓN, EXTRACTOS Y FRACCIONES NO EXTRAÍDAS.	166
2.6.1.	Preparación de las muestras.....	166
2.6.2.	Análisis de AGEEs por cromatografía de gases	167
2.6.3.	Análisis de lípidos neutros por HPLC-ELSD.....	168
2.7.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA	170
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	171
3.1.	ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROLES DEL DDSMO	171
3.2.	ETIL ESTERIFICACIÓN DE LOS AGL DEL DDSMO	176
3.3.	EXTRACCIÓN SUPERCRTICA DEL PRODUCTO FINAL.....	179
4.	CONCLUSIONES	184
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	186

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo continua la línea de investigación del grupo de tecnología de los alimentos de la UAM en lo referente a la obtención de compuestos lipídicos minoritarios, presentes en desodorizados de aceites, a través de la extracción supercrítica con CO₂ en contracorriente [1]. En el citado trabajo se optimizaban las variables supercríticas de extracción con CO₂ para purificar fitoesteroles y tocoferoles de un desodorizado de aceite de girasol, que previamente había sido sometido a una etanolisis química de sus glicéridos.

En el presente capítulo de esta tesis de investigación también se optimizaron variables supercríticas para la purificación de compuestos lipídicos minoritarios, pero en este caso el material de partida fue un desodorizado de aceite de soja sometido previamente a dos etapas enzimáticas.

Los destilados de desodorización de aceite de soja (DDS) son una fuente natural de fitoesteroles y tocoferoles. Aunque se han descrito varias estrategias para purificar estos compuestos de los DDS, la bibliografía muestra que son necesarios nuevos estudios para mejorar tanto el grado de pureza como los rendimientos de los procesos. Shimada y col. [2] convirtieron con éxito los fitoesteroles de DDS en ésteres de esterol y transformaron los acilglicéridos en AGEE por medio de reacciones con lipasas. Posteriormente fraccionaron eficazmente los tocoferoles, fitoesteroles y AGEE por destilación molecular. Este proceso tiene el inconveniente de que los AGL presentes inicialmente en estos DDS y los tocoferoles no se fraccionan eficientemente, debido a la similitud en los puntos de ebullición de las dos sustancias. Este problema podría resolverse mediante la conversión de los ácidos grasos libres en sus ésteres metílicos. Otros autores [3] intentaron desarrollar un sistema de reacción en la que la metil esterificación de los ácidos grasos libres procediera simultáneamente con la conversión de los fitoesteroles en ésteres de esterol y con la hidrólisis de acilglicéridos.

Las reacciones de esterificación de esteroides y etil esterificación de ácidos grasos, catalizadas por lipasas de forma simultánea, se rigen por la concentración de agua presente. El grado en que se produce la esterificación de esteroides en relación con la etil esterificación exige alcanzar un equilibrio no siempre fácil de lograr, debido a que

un exceso de agua favorece la hidrólisis, mientras que la ausencia de agua favorece la esterificación [4]. Sin embargo, mediante la elección adecuada de las condiciones de reacción, es posible separar la esterificación de los esteroides y la etil esterificación en el tiempo o el espacio, lo que permite optimizar cada una de estas reacciones de forma independiente, minimizando los costes o mejorando el rendimiento de los productos finales. Esto es precisamente lo que se realizó en el presente estudio, un proceso con dos etapas enzimáticas independientes, con las lipasas de *C. rugosa* y *C. antarctica*. Para la elección de los biocatalizadores más adecuados se tomaron como referencia estudios previos del propio grupo investigador [5], así como de otros grupos [2].

1.1. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso para obtener, a partir de un destilado de desodorización de soja no apto para el consumo humano, una fracción lipídica rica en ésteres de esterol, tocoferoles y fitoesteroides libres. Como ya se ha descrito anteriormente, estos compuestos han demostrado tener unas actividades biológicas muy interesantes, y están siendo comercializados para elaborar gran variedad de alimentos funcionales.

Además, el estudio también se realizó a escala planta piloto y se estudiaron las estabildades de los biocatalizadores tras varios ciclos de reacción, para un posible escalado industrial del proceso.

El proceso propuesto para la obtención de estos ingredientes funcionales a partir de destilados de desodorización de soja fue el siguiente (Figura 1):

- Modificación del destilado de desodorización de soja inicial añadiendo ácido oleico, para reducir su punto de fusión y poder trabajar en condiciones más suaves de temperatura, favoreciendo la estabilidad de las enzimas y la esterificación de los fitoesteroides.

- Esterificación de los fitoesteroles del destilado de desodorización del aceite de soja, buscando condiciones óptimas de reacción para obtener el máximo rendimiento en ésteres de esterol con ácidos grasos.
- Posteriormente, mediante otra etapa enzimática con adición de etanol, se esterificaron los ácidos grasos que no se consumieron en la etapa de esterificación con fitoesteroles, para obtener ésteres etílicos de ácidos grasos, de menor punto de ebullición, con el objetivo de facilitar su separación de los compuestos de interés mediante tecnología de fluidos supercríticos.
- Extracción de los ésteres etílicos de los ácidos grasos y fraccionamiento de tocoferoles y ésteres de fitoesteroles mediante tecnología de fluidos supercríticos (CO₂) en contracorriente, obteniendo una fracción no extraída rica en ésteres de fitoesterol.

En las etapas enzimáticas del proceso se estudiaron y optimizaron las siguientes variables:

- Temperatura
- Carga enzimática
- Tiempo

En la etapa de extracción supercrítica se estudiaron y optimizaron las siguientes variables:

- Presión
- Temperatura
- Relación solvent to feed (S/F)

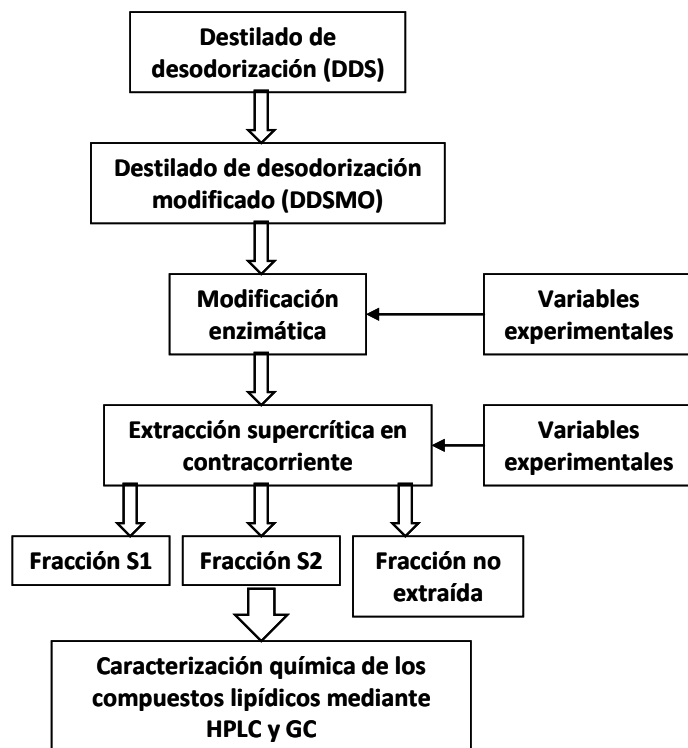


Figura 1. Representación esquemática del proceso propuesto para la obtención de ésteres de esterol a partir de destilados de desodorización de aceite de soja.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

Como material de partida se empleó un destilado de desodorización de aceite de soja modificado, que fue donado por Solutex S.L. (Tarragona, España). Este material contiene gran diversidad de compuestos, pero los constituyentes mayoritarios son esteroides (27% en peso), acilglicéridos (21% en peso), tocoferoles (20% en peso), ácidos grasos libres (19% en peso) y ésteres de esterol (7% en peso). La composición se detalla en la Tabla 2 (Resultados y discusión).

La lipasa de *Candida rugosa* se compró a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). La lipasa de *Candida antarctica* (Novozym 435) fue donada por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). De acuerdo con las especificaciones del proveedor, estos preparados contenían 1179 U/mg y 10 U/mg de lipasa, respectivamente. El ácido oleico se compró a Panreac (Barcelona, España). Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC de Lab-Scan (Dublín, Irlanda).

2.2. Esterificación de los fitoesteros del DDSMO

El destilado de desodorización de aceite de soja, previamente modificado con ácido oleico (DDSMO), fue mezclado con un 10% p/p de la lipasa de *C. rugosa* y se incubó en un agitador orbital (200 rpm) a 35 °C. Se recogieron muestras de 100 µl periódicamente (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 y 24 h), que se disolvieron en 1,5 ml de hexano/etanol/metil tert-butil éter 5/5/1 (v/v/v). El tiempo de reacción fue de 24 h. Las muestras fueron analizadas por HPLC y cromatografía de gases.

2.3. Reacción de etil esterificación

La mezcla de productos de la reacción de esterificación de fitoesteros de soja fue mezclada con un 10% (p/p) de etanol, un 5% (p/p) de Novozym 435 y un 8% (p/p) de hexadecano (patrón interno). La mezcla se incubó en un agitador orbital (200 rpm) a 35 °C. Se recogieron muestras de reacción de 100 µl periódicamente. El tiempo de reacción fue de 24 h. Las muestras fueron analizadas por HPLC y cromatografía de gases.

2.4. Planta piloto de extracción supercrítica

Las extracciones se llevaron a cabo en la planta piloto de extracción supercrítica del grupo de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid. La planta piloto de extracción supercrítica de muestras sólidas fue construida en 1998 por el Grupo de Control de Procesos del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC en colaboración con Iberfluid S.A. Desde el momento de su construcción ha sufrido diversas modificaciones, entre las que cabe destacar el acoplamiento de la columna de extracción en contracorriente con la cual se realizó el presente trabajo (Figura 2). La planta de extracción es, por tanto, mixta, pudiéndose hacer extracciones de muestras sólidas (celda de extracción) o de muestras líquidas (columna de extracción).

Actualmente la planta consta de:

- Dos bombas Dosapro-Milton Roy (Pont Saint Pierre, Francia), una para CO₂ líquido con capacidad de 3,11 L/h, con una presión máxima de 390 bares (397 atm) (modelo MD 99 S (G) 6M 390) y otra para la introducción de modificador/muestra líquida a un caudal máximo de 0,24 L/h y 490 bares de

presión máxima (modelo MD 468 S(F) 3M 490/UU2). Tanto el CO₂ como la muestra líquida se precalientan a la salida de sus respectivas bombas, antes de la introducción en la columna de extracción.

- Una celda de extracción de 270 ml de acero inoxidable 316 de 5 mm de espesor de pared equipada con un filtro en la parte inferior de 5 µm con el doble propósito de evitar que la muestra salga por el orificio de entrada del CO₂ y forzar la dispersión del mismo. Asimismo la celda de extracción cuenta con un fritado de 2 µm en la parte superior para evitar el arrastre de muestra y/o agentes dispersantes.
- Una columna de extracción en contracorriente de acero inoxidable 316 de 100 cm de alto y 12 mm de diámetro interno, rellena de anillos Fenske (3 x 0,5 mm).
- Dos separadores de 270 ml de acero inoxidable 316 de 3 mm de espesor de pared, equipados con válvulas Hoke (mod. 2112L4Y) a la salida para la recogida de extracto y calefacción independiente. Y un tercer separador de 150 ml con capacidad para actuar como trampa criogénica a presión atmosférica. La presencia de estos separadores permite el fraccionamiento en cascada de los extractos mediante caídas consecutivas de densidad.
- Todas las unidades (separadores, celda y columna de extracción) están eléctricamente termostatizadas.
- Válvulas de regulación micrométrica (Swagelok, SS-SS4-Bu) para controlar la presión de cada uno de los tramos de la planta. Dichas válvulas están actuadas mecánicamente por sendos servomotores Axor.
- Sistema de controladores PID (Toho Controlers) conectados de manera bidireccional con un ordenador equipado con software Adquir, diseñado por el Grupo de Control de Procesos del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC.

- Un circuito de limpieza diseñado por el Grupo de Tecnología de los Alimentos de la UAM.
- Elementos de seguridad tales como discos de ruptura LaMot y una válvula de seguridad actuada neumáticamente (Autoclave Engineers) tarados ambos a 400 bares.



Figura 2. Planta piloto de extracción con fluidos supercríticos con la que se ha realizado el presente trabajo (la fotografía de la derecha muestra el módulo con la columna de extracción en contracorriente acoplado en el año 2005).

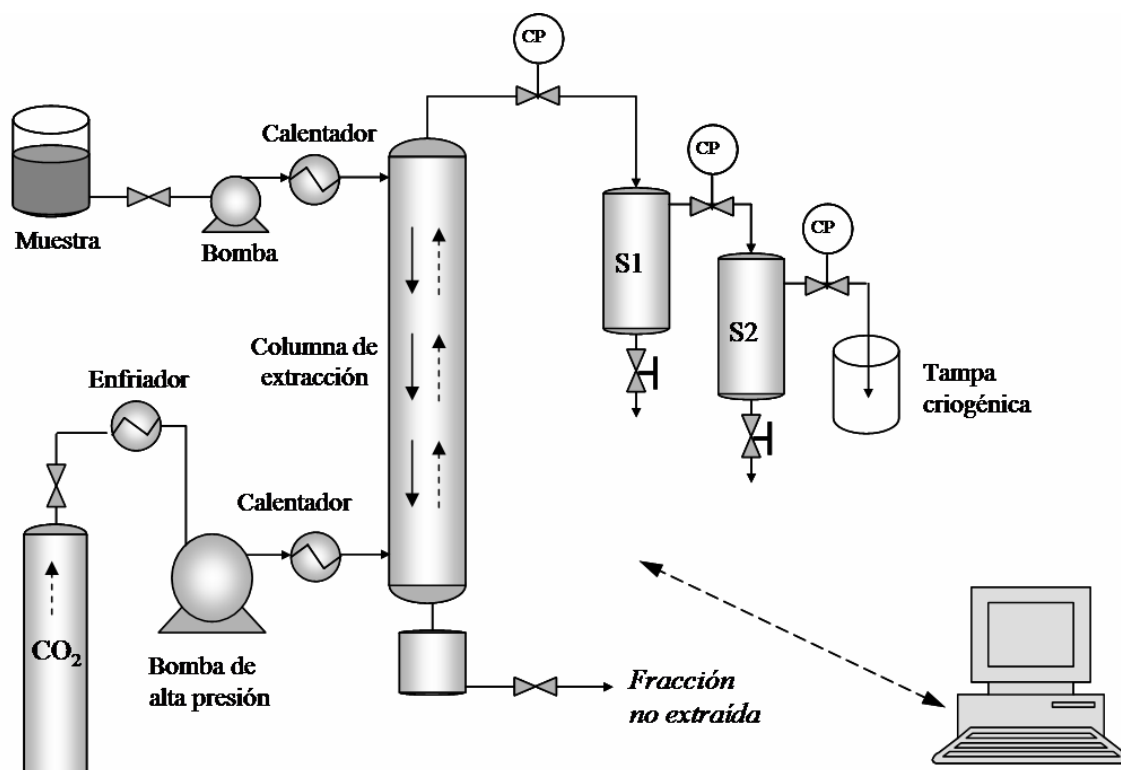


Figura 3. Diagrama de flujo en el que se representa esquemáticamente el funcionamiento de dicha planta piloto utilizando la columna de extracción en contracorriente para muestras líquidas. S1: separador 1; S2: separador 2; CP: controlador de presión.

2.5. Metodología de extracción

El CO₂ proviene de un cilindro a una presión de 55 bares y 20 °C, y después se enfría a una temperatura por debajo de 0 °C, para mantenerlo en estado líquido. Posteriormente, el CO₂ es bombeado al flujo requerido mediante la bomba de membrana de desplazamiento positivo Dosapro Milton Roy

Antes de introducir el CO₂ por la parte inferior de la columna, se precalienta a una temperatura próxima a la temperatura de extracción.

La muestra líquida es precalentada en un baño con agua y en un precalentador antes de su introducción en la columna de extracción. De este modo, se asegura la homogeneidad de la muestra lipídica, ya que se impide la formación de fases sólidas debido a los compuestos con puntos de fusión más altos (ésteres de esterol, tocoferoles, etc.).

Cuando se alcanzan las condiciones de presión y de temperatura en la columna y en los separadores, se comienza a bombear la muestra líquida a 100 ml/h durante un tiempo de extracción de 60 min.

La muestra se introduce por la parte superior de la columna. De este modo se crea un flujo en contracorriente entre la muestra líquida que desciende y el CO₂ supercrítico que asciende en el interior de la columna de extracción. Para que se genere este flujo en contracorriente, es necesario que la muestra líquida tenga una densidad mayor que el CO₂ supercrítico. La diferencia de densidad entre ambas fases debe ser al menos de 100 kg/m³ [6].

Posteriormente, el CO₂ junto con los compuestos extraídos sale por la parte superior de la columna (fase extracto). En los dos separadores, se va disminuyendo secuencialmente la densidad del CO₂, mediante la variación de las variables presión y temperatura. El primer separador se mantuvo a 150-160 bares y 55 °C, mientras que el segundo separador se mantuvo a baja presión (20 bares) y temperatura (15-20 °C). De este modo, se realiza una descompresión por etapas o despresurización en cascada a través de los separadores, obteniéndose un fraccionamiento del extracto. La regulación de la presión en la columna y los separadores se controla mediante unas válvulas de microrregulación (servocontroladas y calefactadas). Las condiciones máximas de trabajo especificadas en las celdas de separación son 200 bares y 100 °C.

En el último separador, se reduce la presión hasta presión atmosférica y se elimina el CO₂ en estado gaseoso de forma espontánea. A la salida de los dos separadores se encuentra una trampa criogénica que recoge compuestos volátiles.

Los compuestos de la muestra menos solubles en el CO₂ supercrítico, que permanecen en la columna de extracción, descienden por ella y se recogen en el fondo como fracción no extraída.

Antes de finalizar la extracción, se detiene la bomba de muestra líquida, y a partir de ese momento se bombea CO₂ puro durante aproximadamente 30 minutos. De este modo se asegura que toda la muestra líquida introducida en la columna sea sometida a extracción con CO₂ supercrítico. No obstante distintos factores como el

volumen de muestra introducido, relación S/F, punto de introducción, viscosidad de la muestra y retención en el relleno, deben tenerse en cuenta para minimizar su posible efecto en la composición y rendimiento de los extractos y las fracciones no extraídas obtenidas al final de la extracción. Una vez terminada la extracción, tiene lugar la despresurización. El balance de materia se cerró en todos los experimentos con una inexactitud inferior al 7,3%, es decir, se recuperó más del 90% del material de partida introducido en la columna.

2.6. Análisis y caracterización de las muestras lipídicas de partida, productos de reacción, extractos y fracciones no extraídas.

2.6.1. Preparación de las muestras

Se ha trabajado con dos tipos de muestras, las procedentes de las reacciones enzimáticas (alícuotas) y las que tenían su origen en las extracciones supercríticas. En el segundo caso las muestras lipídicas podían presentar fases sólidas debido a su contenido en lípidos con elevados puntos de fusión. Estas muestras fueron calentadas a 50 °C en un baño con agua. Se mantuvieron a 50 °C el tiempo necesario para conseguir la completa homogeneización de la muestra. Cuando las muestras fueron completamente homogéneas, se tomaron alícuotas de los diferentes extractos y fracciones no extraídas obtenidas en los procesos de CC-SFE. Las alícuotas se pesaron en una balanza de precisión con un error de $\pm 0,0001$ gramos.

En el caso de las alícuotas (100 μ l) tomadas de la reacciones enzimáticas, estas se mezclaron con 1500 μ l de hexano/etanol/metil-tert-butil eter 5/5/1 (v/v/v) e inmediatamente se filtraron con un filtro de jeringa Sartorius de 0,45 mm (Goettingen, Alemania) para eliminar la enzima. Se dejaron secar en sulfato sódico anhidro durante 2 horas antes de ser analizadas.

En el caso del análisis por cromatografía de gases, 500 μ l de esta disolución final de las muestras se diluyeron con 500 μ l de hexano/etanol/metil-tert-butil eter 5/5/1 (v/v/v), para alcanzar una concentración de 10-15 mg/ml. Este mililitro se trasvaso a un vial de gases de 1,5 ml para su inyección automática.

Para el análisis por HPLC, se evaporaron 400 µl de la disolución final de las muestras en nitrógeno hasta peso constante y el residuo se disolvió en hexano/etanol/metil-tert-butil éter 5/5/1 (v/v/v) hasta una concentración de 1-4 mg/ml.

La elección de la concentración de cada muestra dependió del número de especies químicas presentes para, de este modo, tener concentraciones dentro de los límites en los que se prepararon las curvas de calibrado o factores de respuesta de todos los compuestos.

2.6.2. Análisis de AGEs por cromatografía de gases

Se inyectó 1 µl de una disolución de la muestra en un cromatógrafo de gases (6890N Network GC System) acoplado a un inyector automático (Agilent 7683B), ambos de la marca Agilent (Avondale, PA, EEUU). Se utilizó una columna capilar HP-88 (Avondale, PA, EEUU) de 30 m y 0,25 mm de diámetro interno.

La temperatura del inyector y del detector fue de 220 y 250 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue el siguiente: la temperatura inicial son 100 °C; el horno se va calentando hasta 180 °C a 20 °C/min, aumentando posteriormente de 180 °C hasta 220 °C a 15 °C/min. La temperatura final (220 °C) se mantiene durante 30 min.



Figura 4. Cromatógrafo de gases de la marca Agilent (Avondale, PA, EEUU).

La temperatura del inyector fue de 220 °C y la del detector de 250 °C. La relación de split fue 20:1. Los tiempos de retención de los diversos AGEs se determinaron mediante la inyección de una disolución de PUFA N°3 (#4-7085; Supelco, Bellefonte, PA, EEUU).

2.6.3. Análisis de lípidos neutros por HPLC-ELSD

El análisis de composición de lípidos neutros se efectuó en una columna kromasil silica 60, de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno (Análisis Vínicos, Tomelloso, España) acoplada a un horno CTO 10A VP 2, una bomba LC-10AD VP, un módulo de gradiente FCV-10AL VP, un degasificador DGU-14A y un detector evaporativo de dispersión de luz ELSD-LT de Shimadzu (IZASA, España). Las condiciones del detector fueron 2,2 bares de presión, 35 °C y una ganancia de 3. El flujo de disolvente fue de 2 ml/min. Se usó una válvula Split después de la columna por lo que sólo el 50% de la fase móvil pasaba a través del detector. El bucle utilizado para inyectar las muestras fue de 20 µl.



Figura 5. Equipo de HPLC empleado para el análisis de lípidos neutros. La imagen de la derecha es el detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD).

Se utilizó un método de análisis cromatográfico previamente desarrollado por el grupo de investigación [7]. La composición de la fase móvil del método cromatográfico se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del gradiente de la fase móvil (%).

Tiempo (minutos)	Isooctano	Metil- <i>tert</i> -butil éter *	Isopropanol
0	99,5	0,5	0
3	99,5	0,5	0
3,01	98,5	1,5	0
20	89	11	0
30	75	25	0
30,01	71	27	2
50	71	27	2
50,01	75	25	0
60	75	25	0
61	99,5	0,5	0
70	99,5	0,5	0

* Metil-*tert*-butil éter contenía 0,01% vol/vol de ácido fórmico.

Esta metodología (Figura 6) permite analizar hasta 18 clases diferentes de lípidos neutros, como ácidos grasos libres, fitoesteroles, tocoferoles, ésteres de esteroles, mono-, di- y triglicéridos.

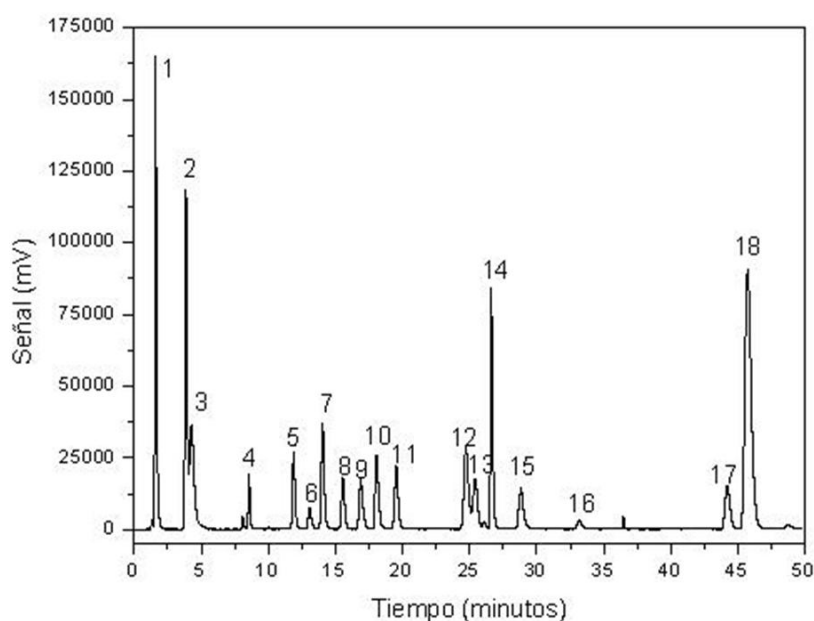


Figura 6. Separación de las diferentes clases de lípidos neutros. 1 escualeno; 2 ésteres de esteroles; 3 ceras; 4 ácidos grasos etil ésteres; 5 alquilglicérols di-esterificados; 6 α -tocoferol; 7 triacilglicérols; 8 β -tocoferol; 9 γ -tocoferol; 10 ácidos grasos libres; 11 δ -tocoferol; 12 dialquilglicérols no esterificados; 13 alquilglicérols mono-esterificados; 14 fitoesteroles; 15 1,3-diglicéridos; 16 1,2-diglicéridos; 17 alquilglicérols no esterificados; 18 monoglicéridos. Cantidad de muestra inyectada (10-20 microgramos).

Con el fin de comprobar la reproducibilidad de nuestra metodología, algunos de los análisis se llevaron a cabo varias veces bajo las mismas condiciones experimentales. La desviación estándar relativa fue inferior al $\pm 15\%$ para los compuestos con un contenido medio por debajo del 1%, inferior al $\pm 10\%$ para los compuestos con un contenido promedio de entre un 5 y un 10%, e inferior al $\pm 2\%$ para los compuestos con un contenido medio superior al 10%.

2.7. Estudio de la estabilidad enzimática

Con el fin de recuperar la lipasa después de las reacciones enzimáticas, la mezcla de productos se filtró a vacío durante 5 min. El sólido obtenido se lavó dos veces con hexano/etanol/metil tert-butil éter 5:5:1 (v/v/v) y se volvió a filtrar a vacío. El mismo procedimiento se utilizó para la lipasa fresca.

La actividad de la lipasa fresca y recuperada se determinó de la siguiente manera: 160 mg de ácido oleico se mezclaron con 40 mg de butanol y 20 mg de Novozyme 435 o 40 mg de lipasa *C. rugosa* en un agitador orbital (200 rpm) a 30 ° C. El tiempo de reacción fue 15 min. La mezcla de productos resultante se enrasó hasta 50 ml con cloroformo. La solución transparente final fue analizada por HPLC para determinar el porcentaje de ácido oleico consumido en la reacción de esterificación. La actividad residual de la lipasa recuperada, en porcentaje, se determinó como la relación entre el ácido oleico que se consume en la reacción con la enzima recuperada y con la enzima fresca.

$$\text{Actividad residual} = \frac{\% \text{ peso ácido oleico consumido por enzima recuperada} \times 100}{\% \text{ peso ácido oleico consumido enzima fresca}}$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Esterificación de los fitoesteres del DDS

En varios estudios sobre esterificación de esteroides catalizada por lipasas los mejores resultados se obtuvieron con la lipasa de *Candida rugosa* [8]. Sin embargo, en nuestro caso el punto de fusión del destilado de desodorización de soja original (65-70 °C) implicaba tener que llevar a cabo la reacción enzimática a temperaturas muy elevadas. Este hecho, unido al efecto negativo del etanol sobre la actividad de ésta lipasa a 65 °C, no nos permitió obtener simultáneamente ésteres de esteroles y ácidos grasos etil ésteres del DDS original. Una alternativa podría ser la adición en etapas de la cantidad de alcohol requerida, ya que se ha demostrado que así se puede evitar satisfactoriamente la inactivación de la lipasa [3]. Desafortunadamente, la reducción de la cantidad de etanol producía una solidificación parcial de nuestra mezcla de reacción, incluso a 65 °C, por lo que finalmente se descartó la esterificación de esteroides y la etil esterificación de los ácidos grasos de manera simultánea.

Otra alternativa previamente publicada [2] consiste en un proceso de destilación para eliminar las sustancias de alto punto de ebullición como los ésteres etílicos de los ácidos grasos, DAG y TAG del DDS antes de la esterificación con lipasas.

En el presente trabajo se añadió una determinada cantidad de ácido oleico al DDS original para obtener una nueva mezcla con menor punto de fusión y una proporción en peso de AGL y fitoesteres de 2. La composición del destilado de desodorización de soja (DDS) utilizado en este estudio y la del destilado de desodorización modificado con ácido oleico (DDSMO) se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.- Composición del destilado de desodorización original de aceite de soja (DDS) y del destilado de desodorización de aceite de soja modificado con ácido oleico (DDSMO).

Porcentaje en peso	DDS	DDSMO
Hidrocarburos	4,5	3,2
Ésteres de esteroles	7,3	6,2
Tocoferoles (α , β , γ)	20,1 (0,9 / 11,7 / 7,5)	16,3 (0,6 / 9,4 / 6,2)
Acilglicerol (TAGs, DAGs, MAGs)	21,1 (8,4 / 4,8 / 8,0)	12,1 (6,1 / 2,5 / 3,5)
Ácidos grasos libres	19,8	40,3
Esterol vegetal	27,1	21,4

Esta modificación de la composición del material de partida permitió llevar a cabo la reacción a 35 °C, reduciendo considerablemente la inactivación térmica de la lipasa. Además, la proporción de ácido graso y esteroles pasó a ser de 2, favoreciendo la esterificación del esteroles en comparación con el destilado de desodorización de soja original DDS. El empleo de un exceso de ácido graso respecto al esteroles en la síntesis de ésteres de esteroles es una estrategia ampliamente utilizada [9, 10].

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada discrimina eficazmente los ésteres de fitoesteroles [5], no actuando sobre el enlace éster que une esteroles y ácido graso. En el citado trabajo se desarrolló un modelo cinético para la reacción de etanolisis de una mezcla que contenía principalmente acilglicerol y ésteres de esteroles.

Basándonos en esta selectividad de la lipasa de *Candida antarctica* es posible convertir acilglicerol y AG en sus correspondientes ésteres etílicos de ácidos grasos sin afectar a los ésteres de fitoesterol del DDS. Además, es ampliamente conocido que la lipasa de *Candida rugosa* cataliza eficazmente la esterificación de fitoesterol con AGL [2, 9]. De ahí que se eligiera una lipasa de *Candida rugosa* para llevar a cabo la esterificación de fitoesterol y una lipasa de *Candida antarctica* para la etil esterificación de los ácidos grasos libres restantes y para la transesterificación de los acilglicerol.

En este trabajo, además, se tuvo en cuenta la estabilidad de la lipasa de *Candida rugosa* utilizada. Siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, se obtuvo

que la actividad residual de la lipasa fue del 85 % tras 24 h de reacción. Este resultado permitió reutilizar el mismo lote de lipasa en posteriores ciclos de reacción.

El resultado de la esterificación de fitoesteroles del DDSMO se muestra en la Figura 7. Como se puede ver en la figura, después de solo 5 h, más del 90 % de los fitoesteroles se transformaron en sus correspondientes ésteres de esterol. Además, los tocoferoles no se vieron afectados tras 24 h de reacción, por lo que se puede asumir que a 35 °C la oxidación de los tocoferoles es insignificante.

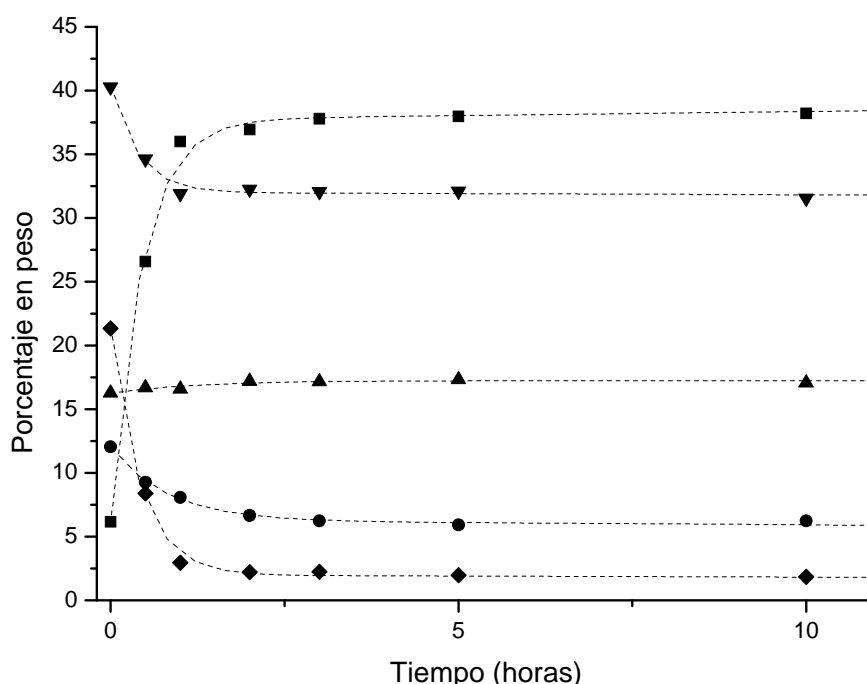


Figura 7.- Esterificación de los fitoesteroles del DDSMO catalizada por lipasa. Condiciones: 10 g de DDSMO, 1 g de lipasa de *Candida rugosa*, 35 °C, 200 rpm. ■ ésteres de esterol, ● acilglicérols, ▲ tocoferoles, ▼ AGL, ◆ fitoesteroles.

Cabe destacar que el contenido de acilglicérols (que comprende la suma de monoacilglicérols (MAG), diacilglicérols (DAG) y triacilglicérols (TAG)) descendió de un 12 a un 5 %, lo cual representa el 60 % de conversión del total de acilglicérols presente en el DDSMO. Este resultado indica que la lipasa de *Candida rugosa* cataliza tanto la esterificación como la transesterificación de acilglicérols con fitoesteroles para producir ésteres de fitoesterol.

La capacidad de la lipasa de *Candida rugosa* de hidrolizar acilgliceroles y esterificar esteroides al mismo tiempo ha sido descrita por varios autores [2, 11]. También se han publicado trabajos que informan de la necesidad de agua o vacío para llevar a cabo la esterificación de esteroides [9, 11]. Por el contrario, en nuestro caso no se añadió agua a la mezcla de reacción ni se hizo vacío para lograr la esterificación de los FT en presencia de *Candida rugosa*. Sin embargo, si que se añadió un exceso de AGL para reducir el punto de fusión del DDS y facilitar la reacción de esterificación. El resto de AGL del producto final, sobrantes de la esterificación de fitoesteroides, se transformaron en sus correspondientes ésteres etílicos de ácidos grasos mediante un segundo paso enzimático, a fin de mejorar su separación de los tocoferoles vía extracción con fluidos supercríticos.

Antes de la segunda etapa, se llevó a cabo el escalado de la primera reacción enzimática. Para esto, se llevaron a cabo más de ocho ciclos de 250 g de la mezcla de reacción usando el mismo lote de lipasa. El resultado de estos ensayos permitió estudiar la estabilidad del biocatalizador y producir bastante material de partida para la segunda reacción enzimática con la lipasa de *Candida antarctica*. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de los ciclos 2, 4, 6 y 8 para su posterior análisis por HPLC. El resultado de este proceso de escalado se muestra en la Figura 8. Parte de lo novedoso de este trabajo radica en que no había ningún estudio previo que hablase de esta reutilización de la lipasa de *Candida rugosa* en reacciones de esterificación de fitoesteroides.

Observando la Figura 8 vemos que a mayor número de ciclos, más lenta es la esterificación de fitoesteroides. A pesar de esto, se consumen más del 85 % de los fitoesteroides iniciales en las primeras dos horas de reacción de todos los ciclos, aunque en el segundo ciclo (Figura 8 A) en la primera hora se consumen más del 95 % de los fitoesteroides, mientras que en octavo ciclo (Figura 8 D) no se alcanza este consumo hasta las 5 horas de reacción. Estos resultados se podrían atribuir, en parte, a la inactivación parcial de la lipasa a lo largo de los sucesivos ciclos. La recuperación de la lipasa se efectuó mediante una simple filtración a vacío del producto de la reacción. Después de cada ciclo no se lavó la lipasa para preservar todo lo posible su actividad. Desafortunadamente, esto provocó ligeros cambios en la composición inicial de la mezcla de reacción en los ciclos de reacción siguientes, originando la presencia de

porcentajes de producto final de ciclos previos que estaban impregnando el polvo enzimático.

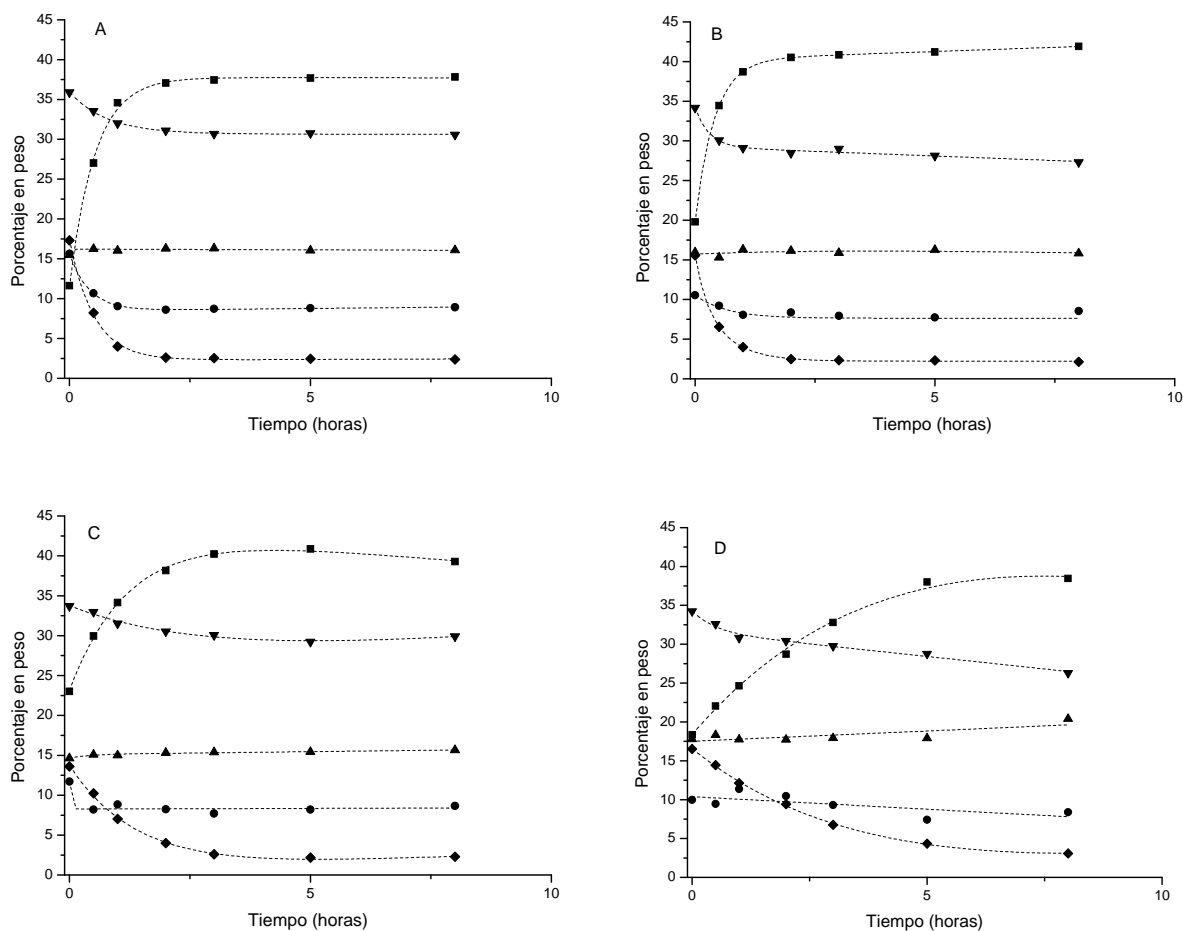


Figura 8. Escalado de la esterificación de fitoesteroles catalizada por lipasa del DDSMO. Ensayos 2, 4, 6 y 8. Condiciones: 250 g de DDSMO, 25 g de lipasa de *Candida rugosa*, 35 °C, 200 rpm. ■ ésteres de esterol, ● acilgliceroles, ▲ tocoferoles, ▼ AGL, ◆ fitoesteroles.

A la vista de los resultados obtenidos, se podrían haber efectuado muchos más ciclos de reacción con un mismo lote de lipasa, ya que los primeros 4 ciclos necesitaron menos de 4 h para consumir más del 85 % de los fitoesteroles totales. En teoría, acortando el tiempo de los primeros ensayos a esas 4 h, se podrían hasta haber duplicado el número de ciclos.

Después del octavo ciclo la lipasa se lavó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado titulado “estudio de la estabilidad enzimática”. La actividad residual de la

lipasa después de 64 horas (8 ciclos de 8 h cada uno) fue inferior al 40 % de la actividad original.

Utilizando esta metodología se procesaron enzimáticamente un total de 2000 g de DDSMO, recuperando 1580 g de los 8 ciclos, lo que represente un rendimiento global del 80 %.

3.2. Etil esterificación de los AGL del DDSMO

Se han publicado estudios sobre la esterificación de esteroides con ácidos grasos y la transesterificación de esteroides con ésteres metílicos de ácidos grasos o TAG, catalizadas por la lipasa Novozym 435 [9]. Sin embargo, no hay mucha información sobre la discriminación de esta lipasa frente a ésteres de esterol en reacciones de hidrólisis o etanolisis [5, 12].

Como se comentó anteriormente, con el objetivo de separar más fácilmente por fluidos supercríticos el AGL restante (del producto final de la primera etapa enzimática) de los tocoferoles y fitoesteroides, se llevó a cabo un segundo paso enzimático de esterificación con etanol de estos AGL. Este segundo paso enzimático mostró como Novozym 435 cataliza la etil esterificación de AGL sin afectar a los residuos de AG de los ésteres de fitoesterol. Observando la Figura 9, vemos que durante la etil esterificación los ésteres de esterol no se vieron afectados.

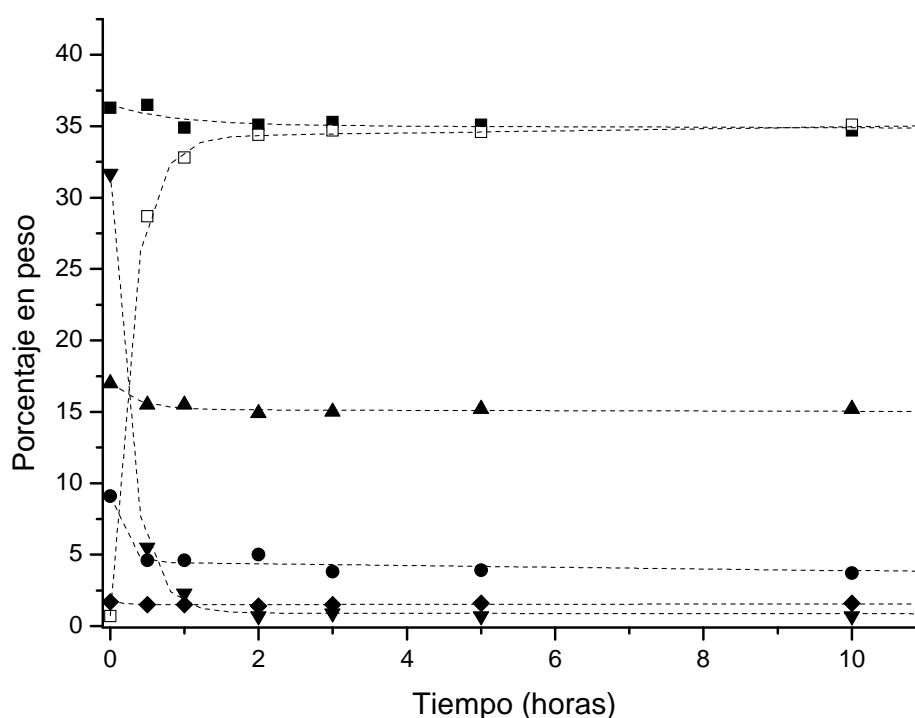


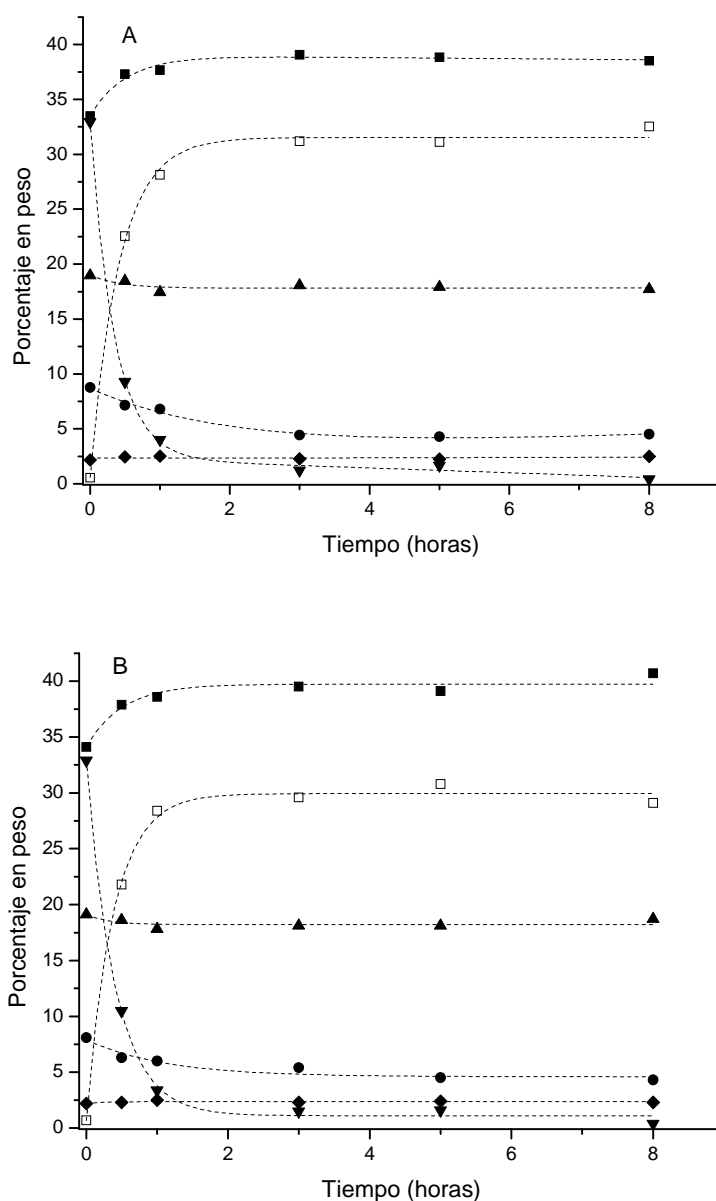
Figura 9.- Etil esterificación enzimática de los AGL del producto obtenido después de la esterificación de fitoesteroles del DDSMO. Condiciones: 10 g de producto, 1 g de etanol, 0,5 g de Novozym 435, 35 °C, 200 rpm. ■ ésteres de esteroles, ● acilglicérols, ▲ tocoferoles, ▼ AGL, ◆ fitoesteroles, □ ésteres etílicos de ácidos grasos.

La etil esterificación de los AGL ocurre en solo 2 h de reacción. A la vista de los resultados, cabe destacar un pequeño descenso del porcentaje total de acilglicérols durante el transcurso de la reacción, lo cual indica que además de la esterificación directa también ocurre una reacción de transesterificación (etanolisis de los glicéridos).

En este caso también se determinó la actividad residual de Novozym 435 después de 24 h de etil esterificación. El grado de inactivación de Novozym 435 tras 24 h de reacción fue del 20 %.

Por ultimo, el proceso se escaló a 250 g y se utilizó el mismo lote de lipasa Novozym 435 en tres ciclos consecutivos (Figura 10 A-C) de 8 h cada uno, procesando un total de 750 g de mezcla de reacción. Igual que en el primer paso enzimático, no se encontró ningún trabajo anterior que hablase de la reutilización de Novozym 435 en reacciones de etil esterificación de DDS. Se efectuó un simple filtrado a vacío del

producto final para recuperar la lipasa. En este caso, tampoco se lavó la lipasa después de cada ciclo del escalado. Como se puede observar en la Figura 10, hay pequeños cambios en la composición inicial de las mezclas de reacción de los sucesivos ciclos, lo que se puede atribuir a la presencia de restos de producto de los ciclos previos que quedan impregnando la lipasa inmovilizada. Podemos destacar que más del 95 % del AGL se consumió en menos de 3 h, observándose que la tasa de reacción es similar en los tres ciclos consecutivos, lo que indica que el grado de inactivación de la lipasa es relativamente bajo.



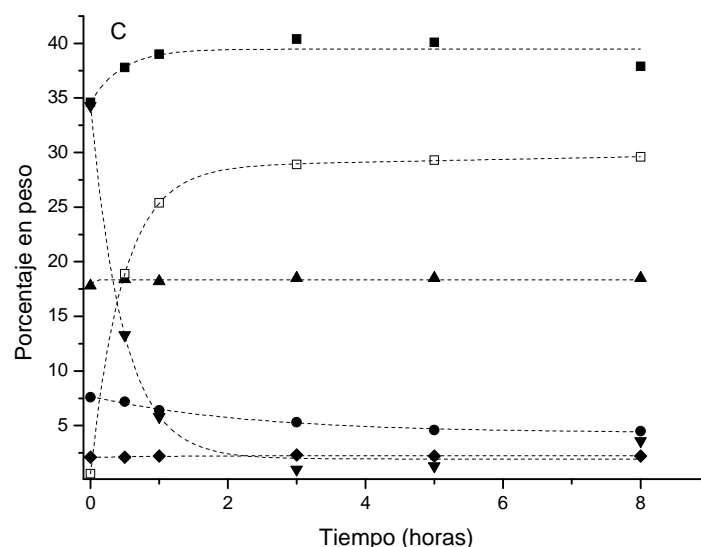


Figura 10.- Escalado de la etil esterificación enzimática de los AGL del producto obtenido después de la esterificación de fitoesteroles del DDSMO. Ensayos 1, 2 y 3. Condiciones: 250 g de producto, 25 g de etanol, 12,5 g de Novozym 435, 35 °C, 200 rpm. ■ ésteres de esterol, ● acilglicérols, ▲ tocoferoles, ▼ AGL, ◆ fitoesteroles, □ ésteres etílicos de ácidos grasos.

Este procedimiento se repitió dos veces, procesando un total de 1500 g del producto obtenido después del primer paso enzimático. Finalmente se recuperaron 1321 g de producto, lo que representa un rendimiento del 90 %.

3.3. Extracción supercrítica del producto final

La composición del DDS original y el material obtenido tras los dos pasos de reacciones enzimáticas (DDS-ME) se muestra en la Tabla 3. Este material se utilizó para el enriquecimiento selectivo en ésteres de fitoesterol mediante SFE en contracorriente.

Tabla 3.- Composición del destilado de desodorización de soja original (DDS), del destilado modificado con ácido oleico (DDSMO) y del producto final obtenido tras las modificaciones enzimáticas (DDS-ME).

Porcentaje en peso	DDS	DDSMO	DDS-ME
Hidrocarburos	4.5	3.2	3.3
Ésteres de fitoesterol	7.3	6.2	38.6
Tocoferoles	20.1	16.3	17.5
Acilglicerol (TAG / DAG / MAG)	21.1 (8.4 / 4.8 / 8.0)	12.1 (6.1 / 2.5 / 3.5)	4.2
Ácidos grasos libres (AGL)	19.8	40.3	4.1
Fitoesteroles	27.1	21.4	2.3
Ésteres etílicos de ácidos grasos			30.0

Trabajos previos han demostrado que a 160-180 bares de presión y 60 °C se puede conseguir la extracción de AGEE de destilados de desodorización vegetales modificados enzimáticamente [13] o usando un gradiente de temperaturas desde 40 hasta 75 °C [14]. En estos trabajos anteriores solo se extraían los ésteres de ácidos grasos, pero en nuestro caso también queríamos extraer los tocoferoles del DDS-ME para concentrar y purificar los ésteres de fitoesterol en la fracción no extraída. Para lograr esto se exploraron presiones superiores a 200 bares y una temperatura fija de 55 °C.

Las diferentes condiciones de extracción empleadas en los ensayos experimentales de SFE (temperatura, presión y relación disolvente/alimentación ó solvent-to-feed (S/F)) se muestran en la Tabla 4. También se muestran las composiciones de las fracciones no extraídas y los rendimientos en ésteres de fitoesterol (cantidad de EF en la fracción no extraída / cantidad de EF en la muestra introducida). Como puede observarse en la Tabla 4, en todos los ensayos experimentales se extrajeron completamente los hidrocarburos, los ésteres etílicos de ácidos grasos y los ácidos grasos libres. Además, se puede apreciar como las presiones más elevadas favorecen mucho la extracción de los tocoferoles, concentrándose los ésteres de fitoesterol en las fracciones no extraídas con rendimientos satisfactorios.

Tabla 4.- Composición y rendimiento en ésteres de fitoesterol de las fracciones no extraídas obtenidas en los ensayos de SFE-CC a las diferentes condiciones de extracción. HID: hidrocarburos, AGEE: ésteres etílicos de ácidos grasos, EF: ésteres de fitoesterol, TOC: tocoferoles, AGL: ácidos grasos libres, E: esteroides libres, TAG: triacilgliceroides.

Ext.	P [bares]	S/F [kg/kg]	T [°C]	Composición de las fracciones no extraídas (%peso sin disolventes)							Rendimiento en EF [%]
				HID	AGEE	EF	TOC	AGL	E	TAG	
1	200	25	55	0.39	0.10	69.20	18.58	0.71	4.19	6.83	94.86
2	225	25	55	0.00	0.06	74.82	13.46	0.00	3.93	7.73	87.90
3	250	25	55	0.00	0.09	77.94	11.25	0.00	3.44	7.28	84.72
4	280	25	55	0.00	0.09	79.71	8.68	0.32	3.23	7.98	70.79
5	200	15	55	0.59	0.30	65.25	21.03	1.43	4.83	6.57	96.30
6	250	35	55	0.00	0.10	82.40	7.51	0.00	2.39	7.60	71.84
7	225	25	45	0.00	0.14	75.90	12.63	0.00	3.97	7.36	88.03

La Figura 11 muestra la variación en porcentaje en peso de EF y tocoferol obtenidos a temperatura y relación solvent-to-feed constantes. Se observa que el porcentaje en peso de los EF incrementa con el aumento de presión, mientras que el porcentaje en peso de tocoferol descende, y las concentraciones de fitoesteroides libres y TAG casi permanecen constantes en las fracciones no extraídas (ver Tabla 4).

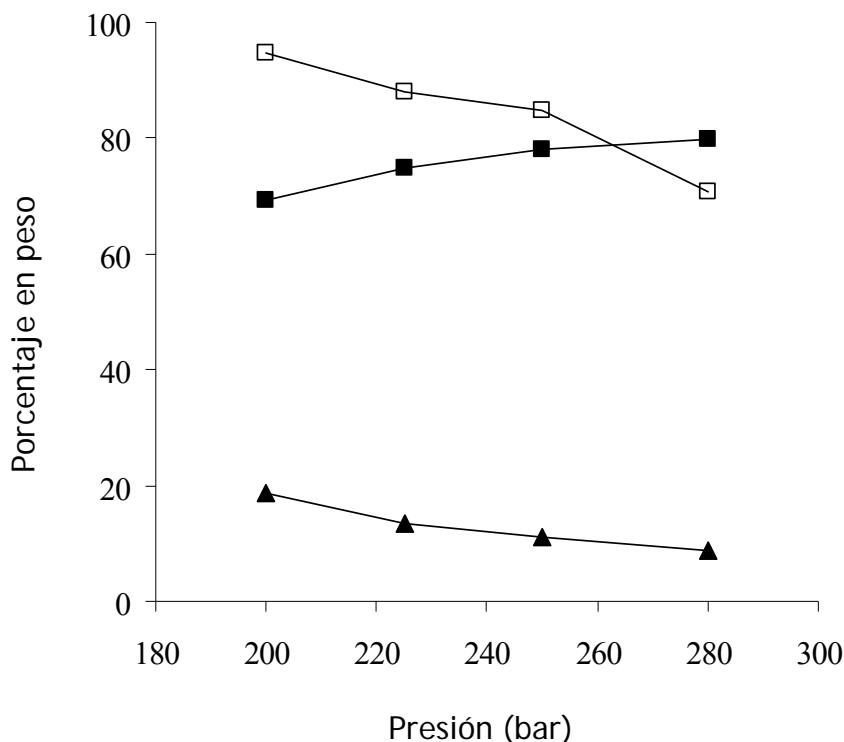


Figura 11.- Rendimiento en ésteres de fitoesterol (□) y porcentaje en peso de ésteres de fitoesterol (■) y tocoferoles (▲) obtenidos en función de la presión de los ensayos de SFE, a 55 °C y una relación solvent-to-feed de 25.

Como se observa en los experimentos 3 y 6 en la Tabla 4, se puede incrementar la pureza de los EF del 77,9 al 82,4 % p/p aumentando la carga de CO₂ (la relación solvent-to-feed pasa de 25 a 35 de un experimento a otro). Este mismo efecto se observó a 200 bares y 55 °C, pero en este caso, incrementando la relación solvent-to-feed de 15 a 25. En cambio, el efecto de la temperatura sobre la pureza y el rendimiento de los EF se vio que era menor, según los datos del experimento 7 efectuado a 45 °C.

Los extractos del producto se fraccionaron por una cascada de descompresión en dos fracciones diferentes llamadas S1 (separador 1) y S2 (separador 2). El resultado de estas fracciones se muestra en la Tabla 5. La fracción S1 se obtuvo a 160 bares y 55 °C y se componía de alrededor de un 40 % p/p de tocoferoles. El factor de enriquecimiento para tocoferoles y fitoesteros libres en el S1 fue de cerca de 2 y 3, respectivamente. También cabe destacar que en este S1 se obtuvo, respecto al material de partida, una composición similar de EF y TAG. Por el contrario, el porcentaje de ésteres etílicos de ácidos grasos fue cercano al 10 % (tres veces menor que en el material inicial). En todos los casos, el peso total de las fracciones recuperadas en el S1 nunca excedió de 18

gramos, lo cual representa menos del 20 % del total del material introducido en la columna.

A 280 bares y 55 °C se recuperaron en el S1 cerca del 60 % del total de tocoferoles introducidos en la columna, mientras que cerca del 90 % del total de los ésteres etílicos de ácidos grasos se recuperaron en el S2. Estos resultados indican que es posible fraccionar los extractos del producto para obtener un extracto rico en tocoferoles y fitoesteroles.

Tabla 5.- Composición de las fracciones obtenidas en los separadores S1 y S2 en los ensayos de SFE-CC. Condiciones en el S1: 160 bares y 55 °C; condiciones en el S2: 20 bares y 55 °C. DDS-ME: destilado de desodorización de aceite de soja modificado enzimáticamente; AGEE: ésteres etílicos de ácidos grasos; EF: ésteres de fitoesterol; TOC: tocoferoles; E: esteroides libres; TAG: triacilgliceroides.

		Separador 1 (S1)					Separador 2 (S2)				
	DDS-ME	Ext.1	Ext.2	Ext.3	Ext.4	Ext.6	Ext.1	Ext.2	Ext.3	Ext.4	Ext.6
AGEE	30.1	10.2	10.0	12.0	16.5	9.4	58.8	61.1	58.3	65.1	58.9
EF	38.7	34.1	28.8	27.4	29.0	32.8	1.7	2.7	1.7	6.1	4.0
TOC	17.4	36.2	41.0	39.4	36.7	40.4	17.8	18.3	15.9	12.6	23.1
E	2.3	5.7	6.6	6.0	5.7	7.7	1.0	1.2	0.8	1.0	2.0
TAG	4.2	5.2	4.9	4.9	5.2	6.6	0.0	0.2	0.0	0.5	0.0

4. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado una metodología que permite obtener ésteres de fitoesterol, tocoferoles y ésteres etílicos de ácidos grasos de destilados de desodorización de aceite de soja, con buenos rendimientos, con buena selectividad y con la preservación de la actividad de los biocatalizadores utilizados.
- El proceso (Figura 12) se centra en dos pasos de modificación enzimática. Se añadió una determinada cantidad de ácido oleico al destilado de desodorizado de soja original para reducir su punto de fusión y para mejorar el progreso de la esterificación de fitoesteroles. En el primer paso, se consiguen transformar el 90% (p/p) de los fitoesteroles en los ésteres de fitoesterol correspondientes en presencia de la lipasa de *Candida rugosa*. Se consiguió escalar el proceso en planta piloto, reutilizando el mismo lote de la lipasa hasta ocho veces con similares porcentajes de conversión final. Una de las ventajas del proceso es que no se necesita añadir agua ni utilizar vacío para llevar a cabo la reacción enzimática, simplificando tanto el proceso como la recuperación de la mezcla de productos.
- El segundo paso enzimático transforma todos los ácidos grasos libres en sus ésteres etílicos correspondientes, consiguiendo altos rendimientos (90% p/p) y sin afectar a los ésteres de fitoesterol, con el objetivo de facilitar su fraccionamiento por fluidos supercríticos.
- Se fraccionaron y purificaron los ésteres de fitoesterol, los tocoferoles y los ésteres etílicos de los ácidos grasos de la mezcla final a través de la extracción con CO₂ supercrítico en contracorriente, obteniendo elevados enriquecimientos y rendimientos, tanto en los extractos (60% de tocoferoles en el primer separador y 90% de ésteres etílicos de los ácidos grasos en el segundo separador) como en las fracciones no extraídas (82% de ésteres de fitoesterol / 72% de rendimiento).

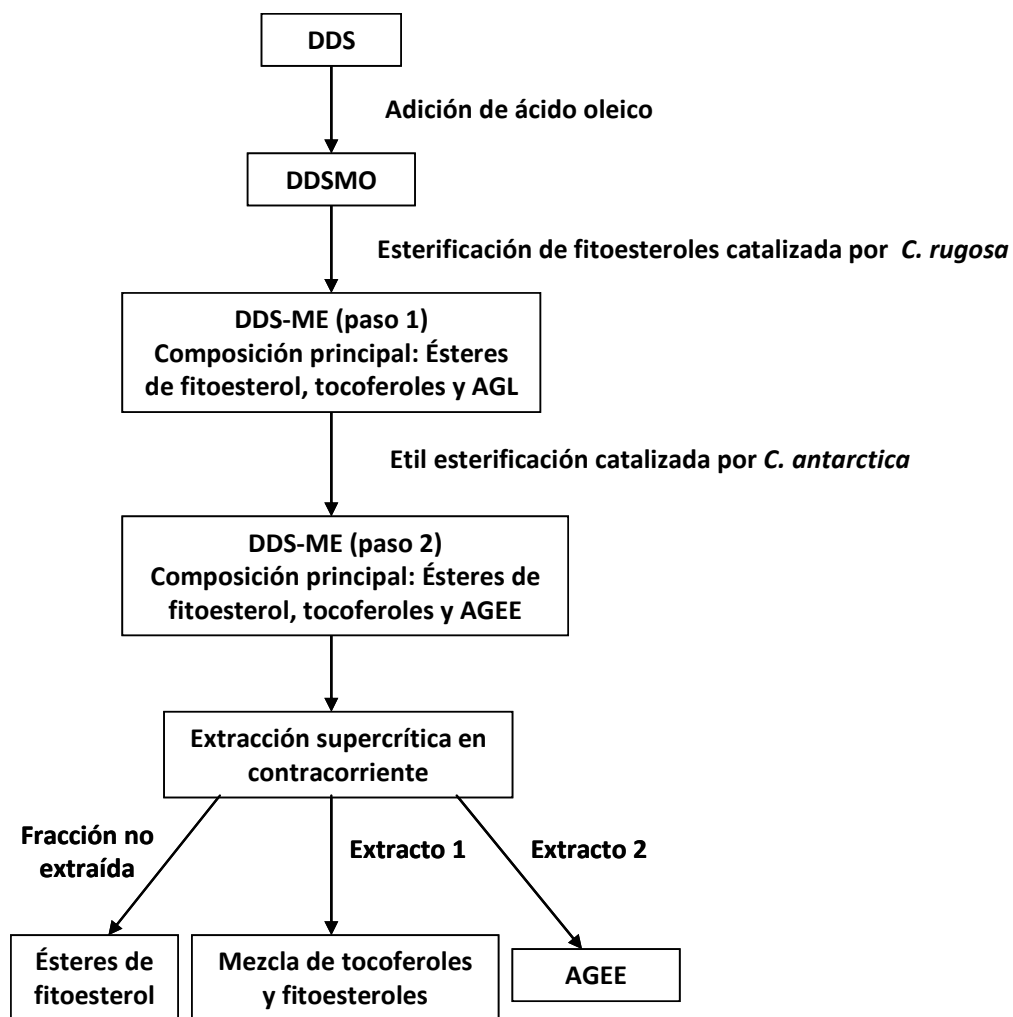


Figura 12. Representación esquemática del proceso desarrollado para la obtención de ésteres de fitoesterol a partir de desodorizados de aceite de soja.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **Vazquez, L., Torres, C.F., Fornari, T., Grigelmo, N., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2006). *Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates*. European Journal of Lipid Science and Technology, 108(8): p. 659-665.
2. **Shimada, Y., Nakai, S., Suenaga, M., Sugihara, A., Kitano, M., & Tominaga, Y.,** (2000). *Facile purification of tocopherols from soybean oil deodorizer distillate in high yield using lipase*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 77(10): p. 1009-1013.
3. **Watanabe, Y., Nagao, T., Hirota, Y., Kitano, M., & Shimada, Y.,** (2004). *Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step in situ enzymatic reaction*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 81(4): p. 339-345.
4. **Marangoni, A.G. & Rousseau, D.,** (1995). *Engineering triacylglycerols: The role of interesterification*. Trends in Food Science & Technology, 6(10): p. 329-335.
5. **Torres, C.F., Tore, A.M., Fornari, T., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2007). *Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study*. Biochemical Engineering Journal, 34(2): p. 165-171.
6. **Brunner, G.,** (1998). *Industrial process development Countercurrent multistage gas extraction (SFE) processes*. The Journal of Supercritical Fluids, 13(1): p. 283-301.
7. **Torres, C.F., Vazquez, L., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2005). *Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector*. Journal of Chromatography A, 1078(1-2): p. 28-34.
8. **Vu, P.L., Shin, J.A., Lim, C.H., & Lee, K.T.,** (2004). *Lipase-catalyzed production of phytosterol esters and their crystallization behavior in corn oil*. Food Research International, 37(2): p. 175-180.
9. **Weber, N., Weitkamp, P., & Mukherjee, K.D.,** (2001). *Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using Candida rugosa lipase as catalyst*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1): p. 67-71.
10. **Shimada, Y., Hirota, Y., Baba, T., Sugihara, A., Moriyama, S., Tominaga, Y., & Terai, T.,** (1999). *Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 76(6): p. 713-716.
11. **Nagao, T., Hirota, Y., Watanabe, Y., Kobayashi, T., Kishimoto, N., Fujita, T., Kitano, M., & Shimada, Y.,** (2004). *Recovery of sterols as fatty acid steryl esters from waste material after purification of tocopherols*. Lipids, 39(8): p. 789-794.
12. **Shimada, Y., Nagao, T., Watanabe, Y., Takagi, Y., & Sugihara, A.,** (2003). *Enzymatic conversion of steryl esters to free sterols*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 80(3): p. 243-247.
13. **Fang, T., Goto, M., Wang, X., Ding, X., Geng, J., Sasaki, M., & Hirose, T.,** (2007). *Separation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide*. Journal of Supercritical Fluids, 40(1): p. 50-58.
14. **Nagesha, G.K., Manohar, B., & Udaya Sankar, K.,** (2003). *Enrichment of tocopherols in modified soy deodorizer distillate using supercritical carbon dioxide extraction*. European Food Research and Technology, 217(5): p. 427-433.

**Capítulo III: Esterificación gradual de
fitoesteroles con ácido linoleico conjugado,
catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en
medio libre de disolventes**

1. INTRODUCCIÓN	191
1.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	191
2. MATERIALES Y MÉTODOS	192
2.1. MUESTRAS Y REACTIVOS	192
2.2. ESTERIFICACIÓN DE LOS ESTEROLES DEL DESTILADO DE DESODORIZACIÓN DE GIRASOL.....	193
2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.....	193
2.4. ANÁLISIS POR HPLC	193
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	193
3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	193
3.2. EFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA	194
3.3. RELACIÓN MOLAR	196
4. CONCLUSIONES	200
5. BIBLIOGRAFÍA.....	201

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha expuesto en la introducción principal, los fitoesteroles y el CLA han demostrado tener numerosas propiedades beneficiosas. En el caso del CLA, basándonos en los resultados con modelos animales y cultivos celulares derivados de humanos y animales, este ácido graso ha demostrado tener diversos efectos beneficiosos para la salud, incluyendo efectos: antiadipogénicos [1, 2], anticarcinogénicos [3], antiaterogénicos [4], antidiabetes [5] y propiedades antiinflamatorias [6].

Por lo general, los numerosos estudios centrados en la esterificación de esteroides con ácidos grasos se han centrado en obtener un compuesto capaz de reducir los niveles de colesterol sanguíneos, utilizando normalmente ácidos grasos omega 6 [7, 8]. Sin embargo hay pocos estudios centrados en el posible efecto sinérgico beneficioso del ácido graso esterificado. Uno de estos estudios comparaba la acción de los distintos ácidos grasos esterificados con fitoesteroides sobre los niveles de lípidos sanguíneos, la biodisponibilidad de carotenoides, la respuesta inflamatoria y algunos marcadores de coagulación [9]. Para ello utilizaron fitoesteroides esterificados con aceite de girasol (FT-AG), con ácido oléico (FT-AO) y con aceite de pescado (FT-AP). Los autores encontraron que los FT-AP reducen los TAG sanguíneos en sujetos hipercolesterolémicos, aumentan las vitaminas liposolubles y tienen menor riesgo de reducir la concentración de carotenoides en el plasma que los FT-AG y FT-AO.

1.1. Objetivos y plan de trabajo

Sobre la base de que ciertos ácidos grasos pueden contribuir a ampliar el efecto saludable de los ésteres de esteroles, se propuso como objetivo la síntesis enzimática de un éster de fitosterol con el CLA como ácido graso. Para la reacción de esterificación se usó la lipasa de *C. rugosa*.

Lo que se espera del éster de fitosterol obtenido es: (I) que sea más soluble que los fitoesteroides, pudiendo administrarse a bajas dosis mientras mantiene su alta bioeficiencia y (II) combine el efecto beneficioso de los fitoesteroides de reducir el colesterol sanguíneo con los efectos del CLA en una sola molécula.

Aunque la esterificación de beta-sitosterol con CLA en agua o hexano ya ha sido estudiada [10], dicho proceso utiliza una relación 3:1 de CLA: beta-sitosterol, con *C. rugosa* como biocatalizador (15% en peso). Nuestro proceso, en cambio, describe una metodología casi cuantitativa para producir los esteres de esterol, lo cual evita tener que separar el exceso de sustrato del producto final; y en un medio sin disolventes, favoreciendo la química “verde” del proceso. Se estudió la carga enzimática, la estabilidad, la temperatura, el vacío y la adición en etapas de los fitoesteres a la mezcla de reacción (Figura 1).

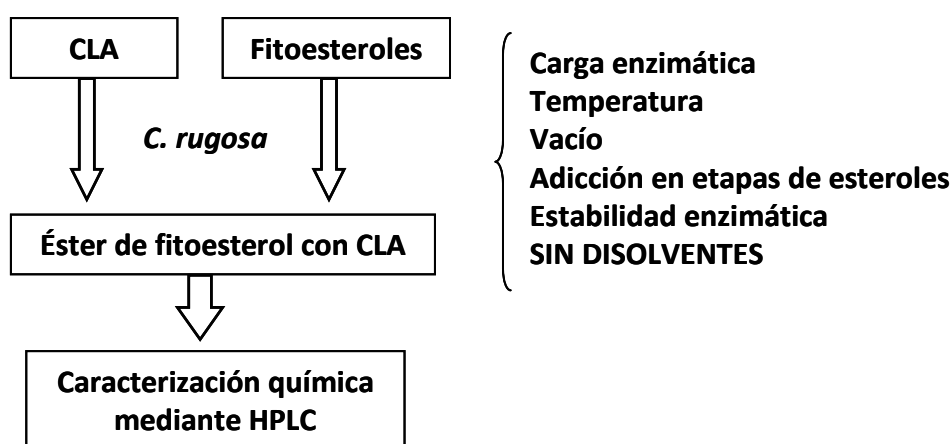


Figura 1. Diagrama de las variables estudiadas en la esterificación de fitoesteres con CLA

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

Como material de partida se empleó una mezcla de fitoesteres que se obtuvo del tratamiento previo de un destilado de desodorización de girasol (DDG). La cristalización, la recuperación posterior y la composición de la mezcla de esteroides se detallan en la siguiente publicación del grupo de investigación [11]. El CLA (pureza superior al 90% p/p) fue un regalo de la empresa Natural ASA (Sandvika, Noruega).

La lipasa de *C. rugosa* se compró a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El preparado contenía 1179 U/mg de lipasa. Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC de Lab-Scan (Dublín, Irlanda).

2.2. Esterificación de los esteroides del destilado de desodorización de girasol

Se mezclaron los reactivos, el CLA (1,5-1,7 g) y diferentes proporciones de la mezcla de fitoesteroides, y se incubaron con la lipasa de *C. rugosa* (5 - 15% p/p) en un agitador orbital (200 rpm) a 35-40 °C. Se recogieron muestras de 50 µl periódicamente (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 24 h y más), que se disolvieron en 1 ml de hexano/etanol/metil tert-butil éter 5/5/1 (v/v/v). Los tiempos de reacción ensayados fueron desde 24 a 168 h. Las muestras fueron analizadas por HPLC-ELSD.

2.3. Estudio de la estabilidad enzimática

La metodología empleada para calcular la actividad residual de la lipasa tras los ciclos de reacción fue la descrita en el capítulo II.

2.4. Análisis por HPLC

Tanto el equipamiento de HPLC, como la metodología de análisis empleada fueron las descritas en el capítulo II.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de la temperatura

La esterificación de la mezcla de esteroides del DDG con CLA fue eficaz a dos temperaturas diferentes. En ambos casos se usó una relación molar 2:1 de CLA: fitoesteroides, con un 10% en peso de lipasa de *C. rugosa*. Ambas reacciones llegaron a la misma composición final (≈ 55 % ésteres de fitoesterol), sin embargo, fueron necesarias más de 10 horas para alcanzar el equilibrio a 35 °C, mientras que a 40 °C, el equilibrio de la reacción se alcanzó en aproximadamente 5 h (Figura 2). Por ello, en los estudios posteriores se utilizará este valor temperatura. Estos resultados indican que la temperatura tiene un efecto significativo sobre la velocidad de la reacción, ya que el aumento de 5 °C prácticamente reduce a la mitad el tiempo de reacción. A pesar de estos resultados, no se estudiaron temperaturas superiores a 40 °C con la idea de preservar la actividad enzimática y proponer un proceso en el que el biocatalizador se pueda reutilizar el mayor número de ciclos posibles.

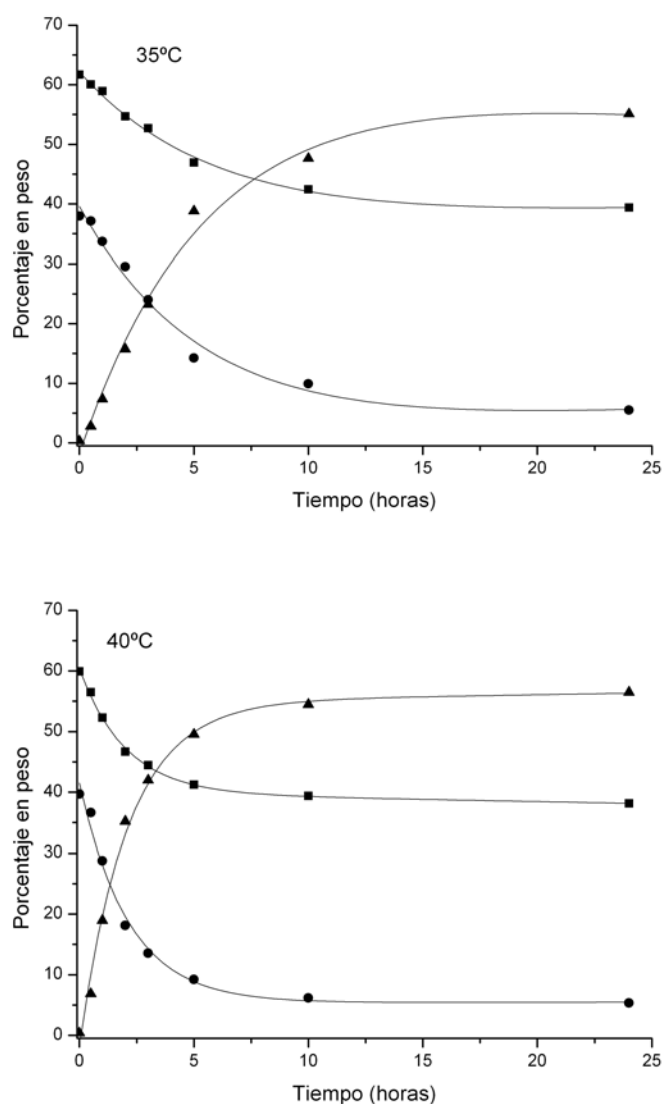


Figura 2. Efecto de la temperatura (35 °C; 40 °C) en la esterificación de los fitoesteros del DDG con CLA, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*. Condiciones de reacción: 1.7 g CLA, 1.25 g fitoesteros, 10% p/p de lipasa. ▲ ésteres de fitosterol; ■ CLA; ● fitoesteros libres.

3.2. Efecto de la cantidad de lipasa

Se investigaron tres porcentajes diferentes de la lipasa (5%, Figura 3A, 10%, Figura 3B, y el 15%, Figura 3C). Las reacciones se llevaron a cabo a 40 °C con una relación molar 2: 1 de CLA: esteroides. Los resultados mostraron que un porcentaje de lipasa por encima del 10% en peso de la mezcla de reacción no aumentaba significativamente la velocidad del proceso (Figura 3 A-C), obteniéndose porcentajes finales de ésteres de fitosterol similares ($\approx 55\%$) con los tres porcentajes de la lipasa. Por tanto, en experimentos posteriores se utilizó un 10% (p/p) de lipasa.

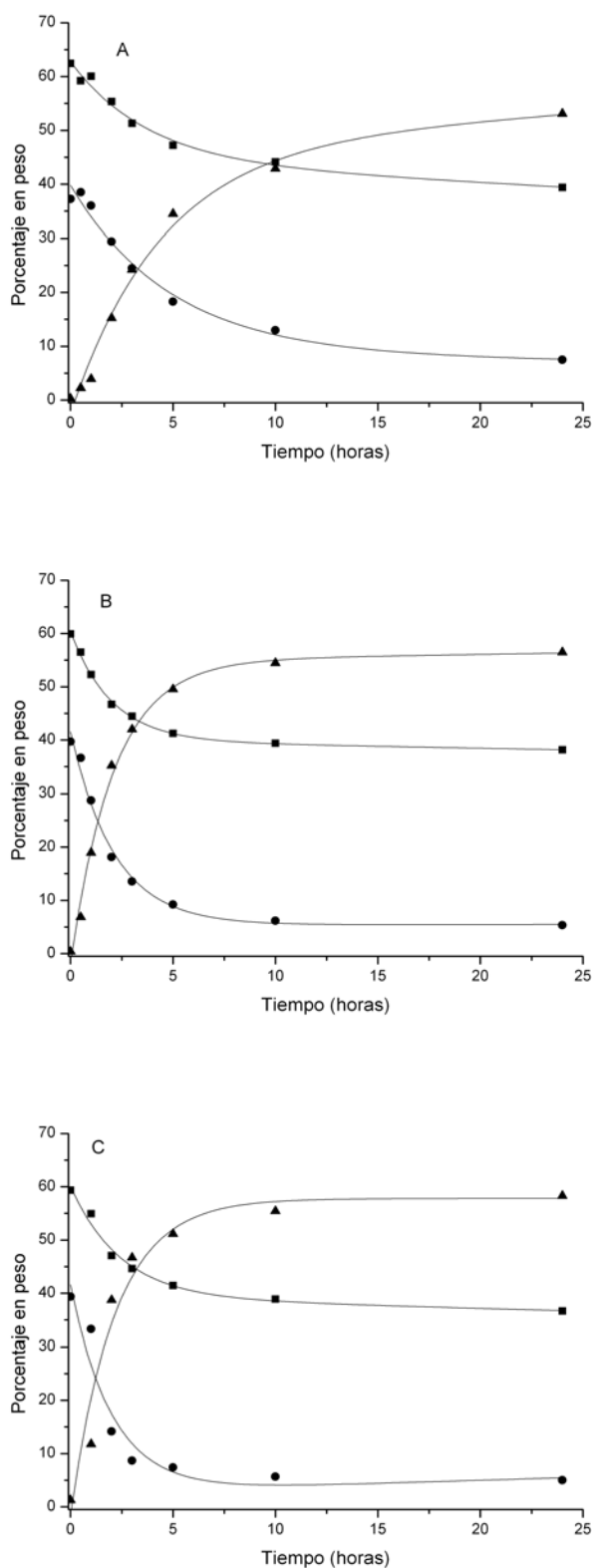


Figura 3. Efecto de la cantidad de lipasa en la esterificación de los fitoesteres del DDG con CLA, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*. (A) 5% de lipasa (p/p), (B) 10% de lipasa (p/p), (C) 15% de lipasa (p/p). Condiciones de reacción: 1.7 g CLA, 1.25 g fitoesteres, 10% p/p de lipasa. ▲ ésteres de fitoesterol; ■ CLA; ● fitoesteres libres.

3.3. Relación molar

La mayoría de los trabajos de esterificación de esteroides sin disolventes encontrados en la bibliografía se han llevado a cabo con un exceso de ácidos grasos frente a los esteroides [12]. En el presente trabajo se estudió el uso de cantidades estequiométricas en la reacción de esterificación de fitoesteroides y CLA. Se observó que con una proporción molar 1:1 de ácidos grasos libres: fitoesteroides no se producía la esterificación directa de estos últimos. Esto pudo ser debido al aumento de la viscosidad de la mezcla de reacción, lo cual produjo dificultades en la transferencia de masa y limitaciones de difusión entre los sustratos y la enzima. Este aumento de viscosidad se constató visualmente, ya que la mezcla de reacción tenía un aspecto pastoso, semi-sólido y poco homogéneo, ya que los FT a penas se disolvían en el ácido graso.

Para solucionar este problema se añadieron los fitoesteroides en dos o tres etapas diferentes con idea de solubilizar mejor los esteroides y favorecer la reacción. La cantidad total de FT, necesaria para transformar todo el CLA en sus correspondientes ésteres de fitosterol, se dividió en tres partes idénticas y se añadieron a la mezcla de reacción a intervalos de 24 h. La Figura 4 muestra los resultados de la incorporación gradual de los FT en tres fases consecutivas.

Los resultados mostraron una disminución drástica de la velocidad de reacción de la primera a la segunda etapa, mientras que la velocidad de reacción fue casi insignificante en la tercera fase. Cabe señalar que la concentración total de los FT al comienzo de la tercera etapa fue aún mayor que en la primera etapa, mientras que la concentración de CLA fue mucho menor (aproximadamente 20%, por un 70% de la primera etapa). Las inspecciones visuales de la mezcla de reacción indicaron un aumento de la viscosidad de la primera a la segunda fase y casi la completa solidificación de la mezcla en la tercera fase.

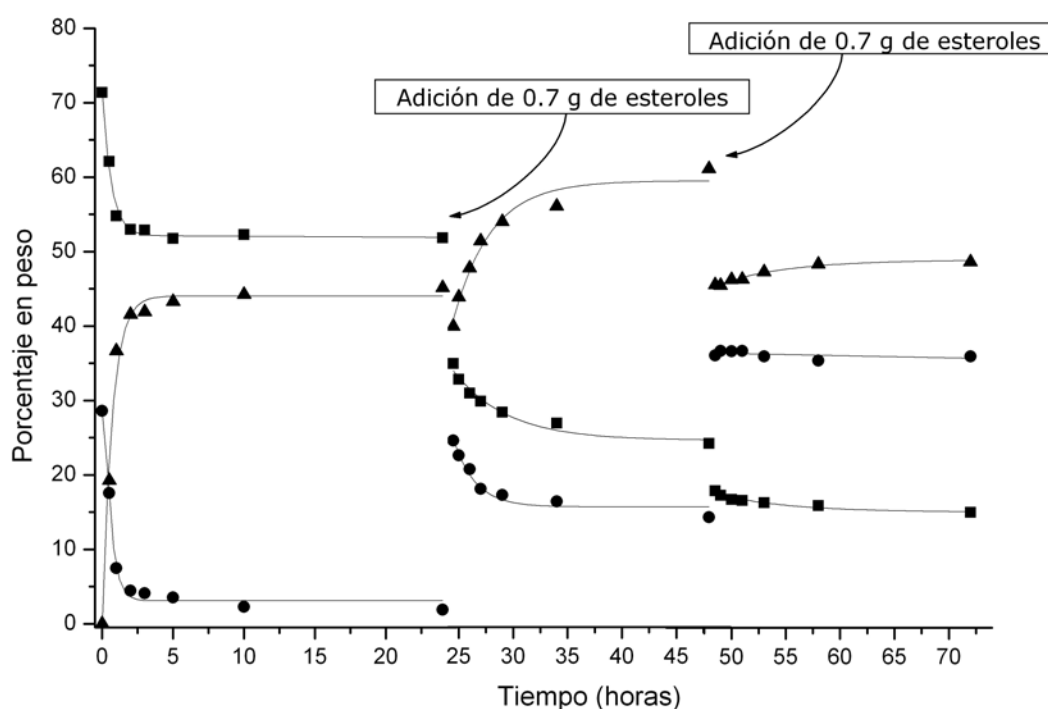
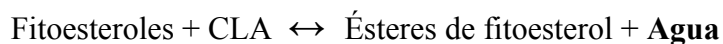


Figura 4. Adición en etapas de los fitoesteros en la esterificación enzimática de los fitoesteros del DDG con CLA. Condiciones de reacción: 1.7 g CLA, 0.7 g esteroides, 10% p/p de lipasa. Tras 24 y 48 h se añadieron 0.7 g de fitoesteros. ▲ ésteres de fitoesterol; ■ CLA; ● fitoesteros libres.

Se determinó la actividad residual de la lipasa después de la tercera fase de la reacción. Después de 72 h, la lipasa mantenía aproximadamente el 50% de su actividad inicial (Figura 4). La conversión de esteroides fue del 90% y 50% (en peso) al final de la primera y la segunda etapa, respectivamente. Este resultado puede indicar que la acumulación de agua durante las dos primeras fases detuvo la esterificación de los esteroides, al producirse un equilibrio entre los sustratos y los productos:



Para solucionar este problema, el agua producida durante la esterificación fue eliminada por la realización de la reacción en vacío (100 milibares). La lipasa de *C. rugosa* es muy eficaz para la esterificación de esteroides, incluso en presencia de una cantidad moderada de agua [13], debido a que necesita un mínimo de actividad de agua

(a_w) para ser funcional. Por este motivo se decidió utilizar el vacío al comienzo de la segunda etapa, para evitar una deshidratación excesiva de la lipasa y preservar su actividad el mayor tiempo posible.

Con el objetivo de reducir el tiempo total de la reacción, se añadieron el total de fitoesteros en sólo dos etapas. Una tercera parte del total de FT se añadieron en la primera etapa (0,7 g; 1,72 mmol) y un poco menos de los dos tercios restantes (1,2 g; 2,95 mmol) se añadieron en la segunda etapa. La relación molar total fue de 4,7 mmol de fitosterol frente a 5,1 mmol de CLA.

La primera etapa de la reacción fue mucho más rápida que la segunda (Figura 5). Después de 5 h de la primera etapa, hubo una conversión de más del 90% de los fitoesteros en sus correspondientes ésteres de fitoesterol. En la segunda etapa la velocidad de la reacción fue casi lineal hasta alcanzar una concentración del 80% de EF después de 120 h, consumiéndose aproximadamente el 90% del total de CLA y el 85% del total de los FT (mmol).

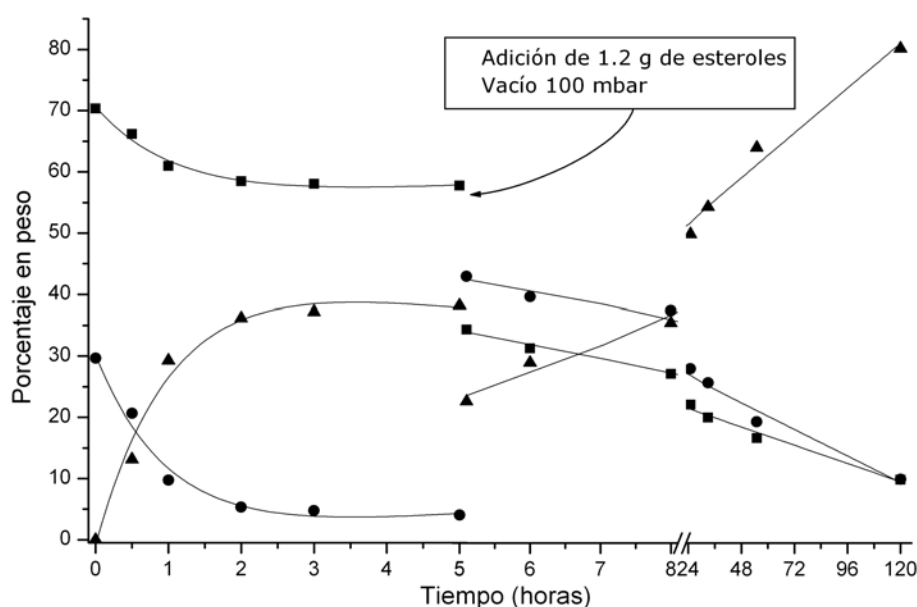


Figura 5. Efecto de la adición en dos etapas de los fitoesteros bajo vacío (100 milibares) en la esterificación enzimática de los fitoesteros del DDG con CLA. Condiciones de reacción: 1.7 g CLA, 0.7 g de FT, 10% p/p de lipasa. Tras 24h se añadieron 1.2 g de FT. ▲ ésteres de fitoesterol; ■ CLA; ● fitoesteros libres.

Por otro lado, la actividad residual lipasa después de más de 100 h de reacción fue aproximadamente de un 35%, indicando que la esterificación estequiométrica de los esteroides con ácidos grasos es posible, aunque un biocatalizador más activo y estable aumentaría enormemente el potencial de esta metodología. En el capítulo IV se abordará el trabajo realizado en la búsqueda de este biocatalizador, amén de la optimización de otras variables con el objetivo de reducir los elevados tiempos de reacción.

4. CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto se puede concluir:

- Se ha desarrollado un proceso enzimático para esterificar fitoesteros con ácido linoleico conjugado, con la lipasa de *Candida rugosa* y sin añadir disolventes.
- Se estudió el efecto de la carga enzimática en la velocidad de la reacción, obteniendo una carga óptima de lipasa del 10% en peso de la mezcla de reacción inicial.
- En este proceso, la adición de los fitoesteros en etapas permite reducir el exceso de ácidos grasos utilizados normalmente en los procesos de esterificación de esteroides; y al realizar la segunda etapa de la reacción a vacío (100 milibares), se elimina la acumulación de agua que impide el curso de la reacción.
- Utilizando esta metodología se obtienen ésteres de fitosterol con una pureza del 80%, consumiéndose más del 90% del ácido linoleico conjugado total.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., & Pariza, M.W.**, (1999). *Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice*. *Lipids* 34: p. 235-241.
2. **Pariza, M.W., Park, Y., & Cook, M.E.**, (2001). *The biologically active isomers of conjugated linoleic acid*. *Progress in Lipid Research*, 40: p. 283-298.
3. **Belury, M.A.**, (2002). *Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid: Potential Mechanisms of Action*. *J. Nutr.*, 132(10): p. 2995-2998.
4. **Kritchevsky, D., Tepper, S., Wright, S., Czarnecki, S., Wilson, T., & Nicolosi, R.**, (2004). *Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: Growth and regression of lesions*. *Lipids*, 39(7): p. 611-616.
5. **Ryder, J.W., Portocarrero, C.P., Song, X.M., Cui, L., Yu, M., Combatsiaris, T., Galuska, D., Bauman, D.E., Barbano, D.M., Charron, M.J., Zierath, J.R., & Houseknecht, K.L.**, (2001). *Isomer-Specific Antidiabetic Properties of Conjugated Linoleic Acid*. *Diabetes*, 50(5): p. 1149-1157.
6. **Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R., & Beitz, D.C.**, (2002). *Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid*. *Clinical Nutrition*, 21(6): p. 451-459.
7. **Weber, N., Weitkamp, P., & Mukherjee, K.D.**, (2001). *Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in vacuo using lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): p. 5210-5216.
8. **Xianghe, M., Peilong, S., Qiuyue, P., Zhongping, S., Kai, Y., & Rongjun, H.**, (2006). *Synthesis of plant sterol esters catalyzed by heteropolyacid in a solvent-free system*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(1): p. 13-18.
9. **Demonty, I., Chan, Y.-M., Pelled, D., & Jones, P.J.H.**, (2006). *Fish-oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish-oil or sunflower oil esters of plant sterols*. *Am J Clin Nutr*, 84(6): p. 1534-1542.
10. **Vu, P.L., Shin, J.A., Lim, C.H., & Lee, K.T.**, (2004). *Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil*. *Food Research International*, 37(2): p. 175-180.
11. **Vazquez, L., Torres, C.F., Fornari, T., Grigelmo, N., Señorans, F.J., & Reglero, G.**, (2006). *Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(8): p. 659-665.
12. **Weber, N., Weitkamp, P., & Mukherjee, K.D.**, (2003). *Steryl and stanyl esters by solvent-free lipase-catalyzed esterification and transesterification in vacuo*. *Fresenius Environ. Bull.* p. 517-522.
13. **Watanabe, Y., Nagao, T., Hirota, Y., Kitano, M., & Shimada, Y.**, (2004). *Purification of tocopherols and phytosterols by a two-step in situ enzymatic reaction*. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(4): p. 339-345.

Capítulo IV: Obtención de concentrados de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media de grasa láctea, por fraccionamiento con CO₂ supercrítico

1.	INTRODUCCIÓN.....	207
1.1.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	208
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	209
2.1.	MUESTRAS Y REACTIVOS	209
2.2.	REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN POR ETANOLISIS EN MEDIO BÁSICO DE LA GRASA LÁCTEA.....	210
2.3.	PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA.....	211
2.4.	METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN.....	211
2.5.	ANÁLISIS DE AGEE DE GRASA LÁCTEA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ON-COLUMN	212
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	212
3.1.	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y RENDIMIENTOS	212
3.2.	COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN EL FRACCIONAMIENTO SUPERCRÍTICO	216
4.	CONCLUSIONES.....	223
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	224

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, el objetivo de la investigación agrícola y alimentaria ha sido el de incrementar el rendimiento y la eficiencia productiva, prestando poca atención a la posibilidad de mejorar el perfil nutricional de los alimentos. El creciente número de evidencias científicas sobre los beneficios potenciales para la salud de ciertos micronutrientes de los alimentos ha dado lugar al concepto de alimentos funcionales y ha ayudado a crear una demanda de alimentos con mejores perfiles nutricionales, sensibilizando a los consumidores [1, 2]. En este sentido, tanto productores como científicos han impulsado en los últimos años investigaciones y nuevas prácticas agrícolas para mejorar el perfil nutricional de los alimentos [3]. Un ejemplo de esto es la industria láctea, con numerosas investigaciones centradas en modificar la composición de la grasa de la leche [4].

Existen en la bibliografía varios estudios sobre el fraccionamiento de la grasa láctea [5, 6]. Sin embargo, la mayoría de estos procedimientos se centran en mantener la identidad de la grasa láctea, intentando fraccionar los distintos triglicéridos y el colesterol, por lo que la composición final en ácidos grasos individuales de las fracciones no varía en gran medida respecto de la grasa láctea original.

La extracción con CO₂ supercrítico se ha utilizado en sistemas continuos o discontinuos para fraccionar la grasa anhidra de la leche en fracciones con propiedades específicas (distinto punto de fusión, distinta composición en AG, etc.), que pudieran tener gran variedad usos [7-9].

Como ya se expuso en la introducción del capítulo I, los ácidos grasos de cadena corta y media han demostrado tener numerosas propiedades beneficiosas para la salud, desde la regulación de los lípidos plasmáticos, a la resistencia a la insulina o la respuesta inflamatoria. Además, dentro de los AGCC, el ácido butírico parece tener potencial como agente anticancerígeno [10, 11].

A priori la grasa láctea puede ser un material de partida relativamente caro, ya que existen otras fuentes naturales más baratas (aceite de coco) que se pueden utilizar para obtener fracciones enriquecidas en AGCM. Sin embargo, su composición única de

ácidos grasos proporciona un excelente material de partida para la producción de extractos altamente enriquecidos, no sólo en AGCM, sino también en AGCC.

Cabe destacar que un tercio de la grasa de la leche contiene una molécula de butirato situado en la posición sn-3, y que más del 50% de los triglicéridos totales de la grasa láctea contienen al menos un AGCC o un AGCM [12]. Estas similitudes entre los TAG hacen que su fraccionamiento por fluidos supercríticos resulte complicado y no permita obtener productos altamente enriquecidos en AGCC y AGCM para aplicaciones nutricionales. Por este motivo, un primer paso debería ser transformar los residuos de ácidos grasos de la grasa láctea en sus correspondientes ésteres etílicos, para facilitar su fraccionamiento sobre la base de las diferentes propiedades físicas y químicas de los distintos ácidos grasos.

1.1. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo del presente estudio fue obtener fracciones ricas en AGCC y AGCM en forma de ésteres etílicos a partir de grasa láctea, para lo cual, previamente se realizó una transesterificación por etanolisis química de los TAG. Para lograr el fraccionamiento se hicieron extracciones con CO₂ supercrítico en contracorriente, a presiones comprendidas entre 89 y 186 bares, y a dos temperaturas diferentes (48 y 60 °C). Las condiciones se eligieron en función de la densidad del fluido supercrítico (se utilizó el programa Allprops¹) y la solubilidad de los AGEE en CO₂ [13]. Para determinar las mejores condiciones de extracción se usaron la composición de los extractos y las fracciones no extraídas.

Las fracciones extraídas podrán ser utilizadas como materia prima para la producción de lípidos funcionales de alto valor. A fin de mejorar la viabilidad económica del proceso, la fracción no extraída, que no tiene un gran interés alimentario, se podría utilizar también para otras aplicaciones industriales sin relación con la alimentación, como por ejemplo la industria del biodiesel.

¹ *Allprops es un programa informático que permite conocer las propiedades termodinámicas de sustancias puras. En este caso, la densidad del CO₂ a una determinada temperatura y presión.*

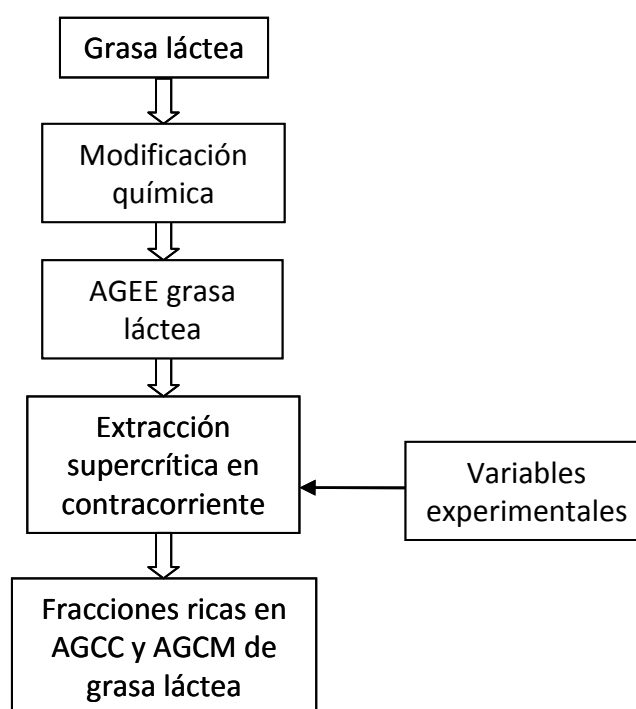


Figura 1. Esquema de trabajo empleado para la optimización de la extracción

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

La grasa láctea utilizada para el fraccionamiento supercrítico de sus AGCC y AGCM fue donada por Industrias Lácteas Asturianas S.A. (Navia, España).

La disolución de etóxido sódico en etanol absoluto al 21 % (p/v) utilizada en la etanolisis de la grasa láctea fue suministrada por Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Todos los disolventes utilizados se adquirieron a Lab Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda) y tenían grado HPLC.

El dióxido de carbono (99.98%) utilizado en las extracciones supercríticas fue suministrado por Air Liquide España S.A. (Madrid).

2.2. Reacción de transesterificación por etanolisis en medio básico de la grasa láctea

En esta reacción los AG que se encuentran esterificados en forma de TAG se transformaron en sus correspondientes AGE. La grasa láctea se mezcló con una disolución del 5,25% (peso/vol) de etóxido sódico en etanol absoluto, en una relación 4:1 (vol:vol). Esta mezcla se mantuvo durante 30 min a 60 °C con agitación en un reactor de 5 litros (Figura 2).

Posteriormente se realizaron dos lavados:

- ⇒ El primero, con una disolución en agua de cloruro sódico (0,5 M) a 50 °C.
- ⇒ El segundo, con agua destilada a 50 °C.

El volumen empleado en estos dos lavados fue la mitad del volumen de la grasa láctea utilizada. Después del segundo lavado, la mezcla se centrifugó a 585 x g durante 10 minutos. Finalmente, el producto de la reacción de etanolisis fue secado con sulfato de sodio anhidro y filtrado a vacío. La composición del producto final se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del producto de la etanolisis de la grasa láctea

<i>Ácido graso</i>	<i>Porcentaje en peso</i>
C4	3,2
C6	2,3
C8	1,4
C10	3,4
C12	3,7
C14	11,7
C16	27,7
C18	8,8
C18:1-C18:2	36,9



Figura 2. Reactor con tapa de 5 vías y manta térmica (Afora, España), agitador mecánico (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), controlador para la temperatura (Selecta, Abrera, España) y criostato (Huber, Offenburg, Alemania) que condensa los vapores generados durante la reacción.

2.3. Planta piloto de extracción supercrítica

El equipo de extracción supercrítica empleado fue el mismo descrito en el capítulo II.

2.4. Metodología de extracción

Durante las extracciones se introdujo un flujo continuo de CO₂ en la columna a través de la parte inferior. Cuando se alcanzaron la presión y la temperatura de experimentación se bombeó el producto final de la etanolisis de la grasa láctea (100

ml/h) por la parte superior durante el tiempo de extracción (60 min). La relación entre el flujo de CO₂ y el de grasa láctea (solvent to feed) fue de 15.

El primer separador se mantuvo a 60 bares y 20 °C, mientras que el segundo separador se mantuvo a baja presión y temperatura (20 bares y 10 °C) para evitar la pérdida por arrastre de los AGEE de cadena más corta (enfriando con hielo en la trampa fría del equipo). Los extractos recogidos en los separadores y los refinados fueron pesados y analizados por GC. El balance de materia se cerró en todos los experimentos con una inexactitud inferior al 7,4%, es decir, se recuperó más del 90% del material de partida.

2.5. Análisis de AGEE de grasa láctea por cromatografía de gases on-column

Para el análisis de los AGEE de la grasa láctea, se inyectaron 0,2 µl de una disolución de la muestra a una concentración de ~4 mg/ml en cloroformo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II con inyección on-column, columna capilar de 7 metros y 0.25 µm de diámetro interno (5% fenil metil silicona, Quadrex Corporation, New Haven, CT). Como precolumna se usó una sección de la columna desactivada (12 cm × 530 µm d. i.). Las temperaturas del inyector y el detector fueron 43 °C y 360 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue el siguiente: empezando a 40 °C; el horno se calentó hasta 250 °C a 42 °C/min, manteniendo esta temperatura 10 minutos; posteriormente se aumenta de 250 °C hasta 325 °C a 7,5 °C/min, manteniendo la temperatura final 20 minutos. Se usó helio como gas portador a una presión de 0,036 MPa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Condiciones de extracción y rendimientos

Se consiguió fraccionar eficazmente los AGEE de grasa láctea a través de la extracción con CO₂ supercrítico en contracorriente a presiones que iban desde 89 hasta 186 bares y a 2 temperaturas diferentes (48 y 60 °C). Este amplio intervalo de condiciones de extracción se seleccionó en base al balance de masas entre los extractos

y los refinados, es decir, se exploraron aquellas condiciones de extracción que producen desde un pequeño porcentaje de extracto a las que producen una extracción casi total de los AGEE. Con este objetivo, se usaron diferentes densidades de CO₂ supercrítico, variando la presión y la temperatura. A mayor temperatura, menor es la densidad del CO₂, dándose el efecto contrario con la presión. La gama de densidades de CO₂ utilizado en el presente estudio fue de 0,3 a 0,7 g/ml.

Cabe señalar que a densidades de CO₂ de 0,3 g/ml (89 bares y 48 °C, y 101 bares y 60 °C), aproximadamente el 10% (p/p) del material que se introduce en la columna se extrajo. Por el contrario, todo el material introducido en la columna fue extraído con una densidad de CO₂ de 0,7 g/ml (186 bares y 60 °C), es decir, no se obtuvo fracción no extraída.

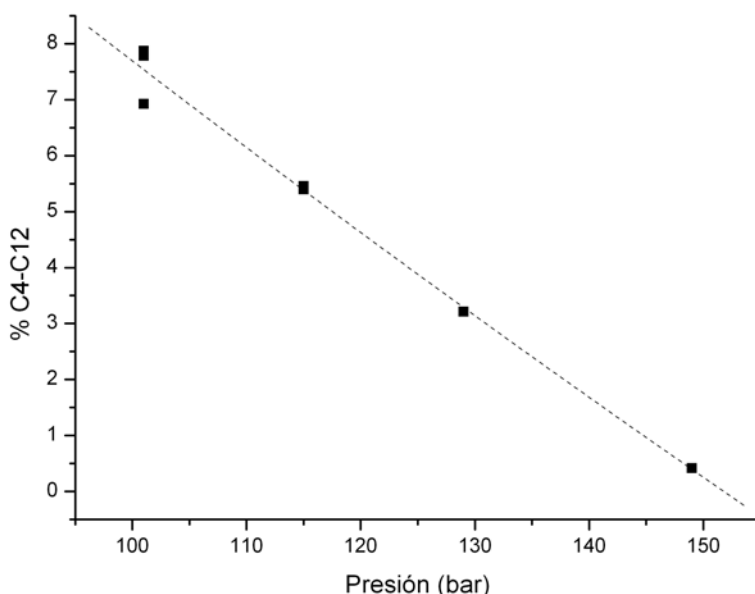
También es importante destacar que el balance de masa para el AGCC más pequeño de la mezcla, el butirato de etilo, fue menor (50-70%) que para el resto de AGEE (~ 100%). A pesar de que la despresurización de los extractos se realiza en cascada en dos etapas consecutivas (60 bares y 20 °C en el primer separador, y 20 bares y 10 °C en el segundo), el butirato de etilo tiene una presión de vapor relativamente alta (11.3 mm Hg), incluso a 20 bares y 10 °C, lo que impide su recuperación completa debido a las limitaciones del equipo utilizado, incluso poniendo hielo en la trampa criogénica, ya que una parte se elimina vaporizada con el CO₂ que se expulsa al exterior al final de la extracción.

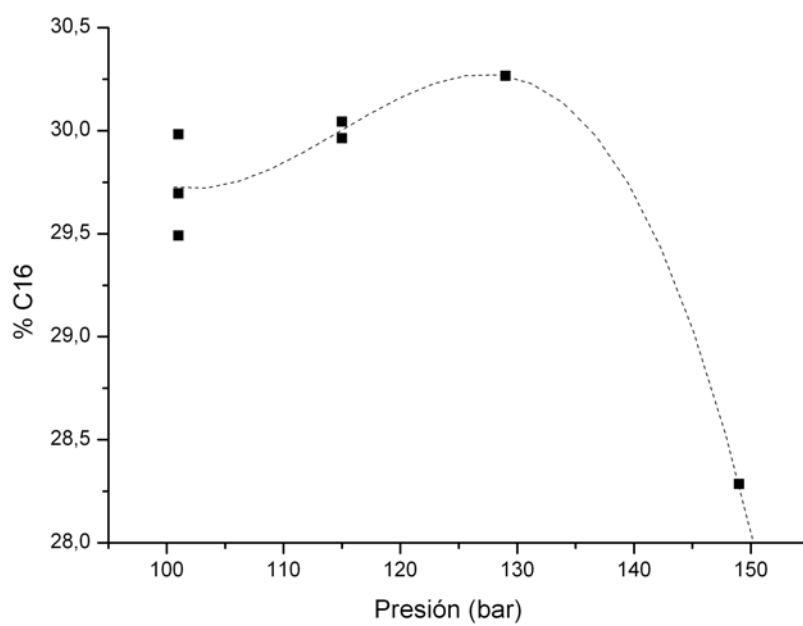
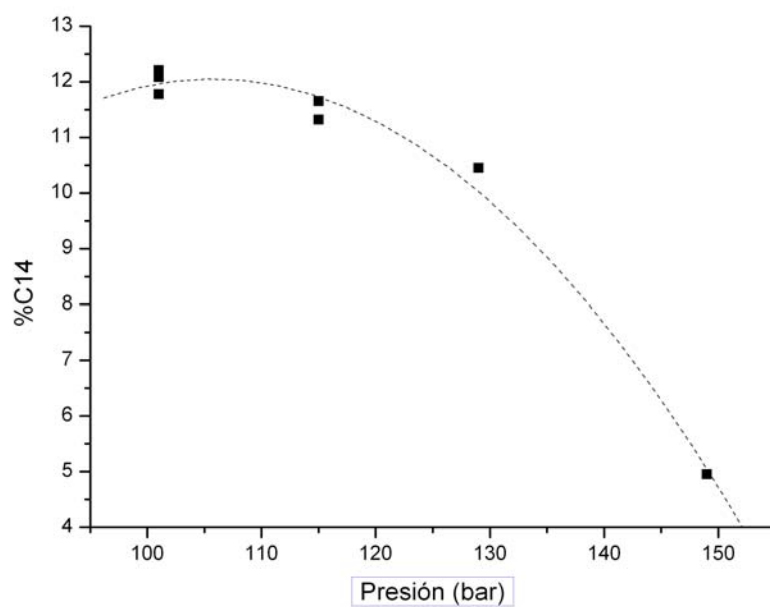
Para comprobar la reproducibilidad de la metodología de fraccionamiento utilizada, se han representado algunos de los experimentos de extracción en la Tablas 2, 3, 4 y 5. El examen de los resultados de estos experimentos (por ejemplo, extracciones 1, 2 y 3, o extracciones 4 y 5 de la Tabla 4) indica algo de fluctuación en la composición y los rendimientos, especialmente para los AGCC. En estos experimentos, el porcentaje de C4 en las extracciones 1, 2 y 3 fluctúa desde un 18 hasta un 24%, y en las extracciones 4 y 5 del 4 a 9%. Estas fluctuaciones pueden atribuirse a la alta volatilidad de estos compuestos, lo cual hace que se evaporen parcialmente durante el tiempo que están precipitados en las celdas de extracción.

Otro aspecto importante del fraccionamiento es determinar cómo se dividen los diferentes AGEE entre los extractos y las fracciones no extraídas. La Figura 3 muestra la tendencia de la composición de los diferentes AGEE frente a la presión utilizada en el fraccionamiento con CO₂ supercrítico. Examinando la Figura 2 se observa que aproximadamente el 50% del AGEE C14 es extraído a 115 bares, mientras que para extraer completamente todos los AGEE C14 es necesaria una presión de 150 bares.

Por otro lado, el AGEE C16 se acumula en la fracción no extraída a presiones inferiores a 130 bares, mientras que se extrae completamente a 150 bares. Los AGEE C18:1 y C18:2 se acumulan en la fracción no extraída, incluso a una presión de 150 bares, lo que indica que en estas condiciones de extracción podrían ser fraccionados eficazmente de los AGEE de cadena corta.

La Figura 3 también indica que a 60 °C, la extracción de AGCC y AGCM tiene lugar incluso a la presión más baja investigada. Sin embargo, para extraer eficientemente estos ácidos grasos se debe utilizar presiones de hasta 129 bares, condiciones en las se extraen también una cantidad significativa de AGEE C14 y C16. Por esta razón, es necesario lograr un equilibrio entre composición y rendimiento, para obtener extractos altamente enriquecidos en AGCC y AGCM con rendimientos aceptables.





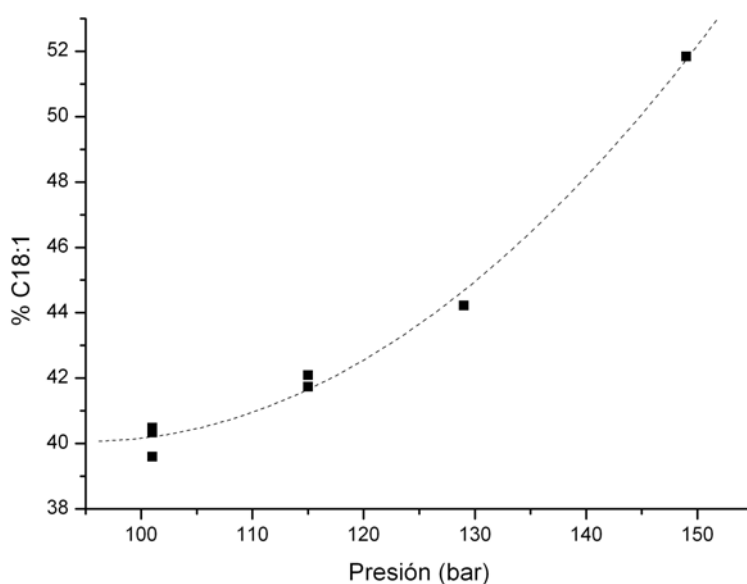


Figura 3. Composición en determinados AGEE de las fracciones no extraídas para las extracciones a 60 °C (de la 8 a la 14).

3.2. Composición de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento supercrítico

Se puede observar en la Tabla 4 que los extractos más enriquecidos en ésteres etílicos de AGCC y AGCM se obtienen a 89 bares y 48 °C (extracciones 1 y 2) y 101 bares y 60 °C (extracciones 8, 9 y 10). En estas dos condiciones de extracción (densidad de 0,3 g de CO₂/ml), se obtuvo aproximadamente un 20% de C4 en los extractos. Considerando que el porcentaje original de C4 en la grasa láctea es de un 3%, se puede afirmar que este AGEE de cadena corta se puede fraccionar eficazmente.

La composición de los extractos y las fracciones no extraídas se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente. Se puede observar como con la menor densidad de CO₂ estudiada (0,3 g/ml), sólo un 10% (aproximadamente) de los AGEE de cadena corta se encuentra en la fracción no extraída.

Para calcular la eficacia del fraccionamiento obtenido, es muy útil usar el concepto de **factor de enriquecimiento**. Este factor, que se obtiene como la relación entre la composición en el extracto y la composición en la mezcla original de AGEE de la grasa láctea, se encontró que era mayor de 7 para los AGEE C4 y C6. Este resultado

indica la eficiencia del fraccionamiento llevado a cabo, además de la evidencia de la imposibilidad de alcanzar un fraccionamiento similar si se hubiese utilizado la grasa láctea original en forma de triglicéridos.

Ejemplo: Factor de enriquecimiento C4 (extracción 1) = $24,3 / 3,2 = 7,6$

Mediante esta metodología, es posible obtener extractos con una riqueza del 70% (p/p) de ésteres etílicos de AGCC y AGCM, con buenos porcentajes de recuperación (más de 80%).

Tabla 2. Rendimientos en porcentaje en peso (% p/p) de los extractos obtenidos en el fraccionamiento con fluidos supercríticos.

	Extracciones														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Condiciones															
Presión	89	89	98	105	105	117	142	101	101	101	115	115	129	149	186
Temperatura	48	48	48	48	48	48	48	60	60	60	60	60	60	60	60
Rendimientos															
C4	65,2	65,6	74,9	46,4	76,5	72,5	81,3	60,8	58,6	59	63,1	72,3	75,8	67,4	66,7
C6	69,1	65,6	83	70,8	92	83	87,3	76,6	77,1	56,6	84,1	88,7	92,3	82,5	88,6
C8	41,2	37,8	62	88	99,1	93,1	96,5	47,3	50,3	35,4	81,3	80,1	99,4	91,8	100,5
C10	23,3	20,1	37,1	87,7	78,9	93,4	97,4	25,3	27	20,9	49,3	49,3	87,3	91,9	102,6
C12	13,5	11,7	22,8	64,5	52,6	92,3	98,3	14,3	15,4	10,7	29,8	30,3	60,2	89,9	100,4
C14	7,5	7,9	13,6	45,1	34,4	86,3	97,8	9,2	7,8	5,1	18,3	19,4	40,7	80,1	99,8
C16	4	5,4	7,7	31,3	21,3	68,5	97,1	5,3	3,8	2,5	11,9	11,4	26,3	63	98
C18	2,3	4,1	4,4	21,2	13,2	50,8	96,7	3,2	2,1	1,4	7,5	6,4	17,5	49,1	96,5
C18:1- C18:2	2,6	4,1	4,9	23,5	14,6	55	97,2	3,5	2,2	1,6	8,1	7,1	19,1	52,2	97,3

Tabla 3. Rendimientos en porcentaje en peso (% p/p) de las fracciones no extraídas obtenidas en el fraccionamiento con fluidos supercríticos.

	Extracciones													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Condiciones														
Presión	89	89	98	105	105	117	142	101	101	101	115	115	129	149
Temperatura	48	48	48	48	48	48	48	60	60	60	60	60	60	60
Rendimientos														
C4	7,9	2,3	10,3	0	0	0	0	11,2	0	0	0	0	6,7	0
C6	13,1	19,5	4,4	0	0	0	0	10,5	6,4	21,9	0	0	0	0
C8	56	58,3	32,7	0	0	0	0,2	49,6	42,4	57,1	11,6	16,8	0	0
C10	73,9	75,8	60,7	0	20,7	0	0,3	71,5	68,9	76,6	46	48,5	11,7	1,1
C12	83,5	83,7	76,2	30,6	49,8	1,3	0,3	81,3	81,7	89,3	66,5	67,8	38,6	2,9
C14	87,8	86,9	84,5	52,7	67,4	9,1	0,3	86,8	90,8	95,2	77,1	77,7	56,7	14,5
C16	90,8	89,4	90,9	67,4	79,3	29,8	0,4	91,6	94,9	97,6	83,8	86,7	69,2	35
C18	94,3	91,9	94,8	76,8	88,4	49	0,4	94,2	95,8	100	88,7	92,7	77,4	51,4
C18:1-C18:2	93,8	90,9	94,3	75,1	85,4	44,9	0,4	94,2	96,4	97,9	87,6	91,6	76,1	48,3

Tabla 4. Composición (% p/p) en AGEE de la grasa láctea original y los extractos obtenidos en el fraccionamiento con fluidos supercríticos.

	Grasa láctea	Extracciones														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Condiciones																
Presión		89	89	98	105	105	117	142	101	101	101	115	115	129	149	186
Temperatura		48	48	48	48	48	48	48	60	60	60	60	60	60	60	60
Composición																
C4	3,2	24,3	22,2	18,3	4,4	9,1	3,5	2,7	19,9	21,6	28,1	12	13,8	7,7	3,5	2,2
C6	2,3	18	15,5	14,2	4,7	7,7	2,8	2	17,5	19,8	18,9	11,2	11,9	6,5	3	2,1
C8	1,4	6,5	5,4	6,4	3,5	5	1,9	1,4	6,5	7,8	7,1	6,5	6,5	4,3	2	1,4
C10	3,4	9,2	7,2	9,5	8,7	9,9	4,8	3,4	8,7	10,5	10,5	9,9	9,9	9,3	5	3,6
C12	3,7	5,7	4,5	6,4	6,9	7,2	5,1	3,8	5,3	6,4	5,8	6,5	6,6	7	5,3	3,8
C14	11,7	10,1	9,6	12	15,3	14,8	15,2	11,9	10,9	10,3	8,7	12,6	13,4	14,9	15	12
C16	27,7	12,8	15,7	16,2	25,3	21,8	28,6	27,9	15	11,9	10,2	19,4	18,7	22,9	27,9	28,1
C18	8,8	2,3	3,7	2,9	5,4	4,3	6,7	8,8	2,9	2,1	1,8	3,9	3,3	4,8	6,9	8,7
C18:1-C18:2	36,9	10,9	15,8	13,7	25,2	19,8	30,6	37,1	13	9,3	8,6	17,6	15,5	22	30,8	37,1

Tabla 5. Composición (% p/p) en AGEE de las fracciones no extraídas obtenidas en el fraccionamiento con fluidos supercríticos.

	Extracciones													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Condiciones														
Presión	89	89	98	105	105	117	142	101	101	101	115	115	129	149
Temperatura	48	48	48	48	48	48	48	60	60	60	60	60	60	60
Composición														
C4	0,3	0,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
C6	0,3	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
C8	0,9	0,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,7	0,8	0,7	0,9	0,2	0,3	0,0	0,0
C10	2,9	3,1	2,4	0,0	1,0	0,0	2,7	2,8	2,7	2,9	2,0	2,1	0,6	0,1
C12	3,6	3,7	3,3	1,8	2,5	0,2	3,4	3,5	3,4	3,6	3,2	3,1	2,2	0,3
C14	11,9	12,0	11,6	10,1	10,9	3,5	11,8	11,8	12,1	12,2	11,7	11,3	10,5	5,0
C16	29,2	29,4	29,7	30,6	30,4	26,9	29,7	29,5	30,0	29,7	30,0	30,0	30,3	28,3
C18	9,6	9,6	9,8	11,0	10,7	14,0	9,8	9,6	9,6	9,6	10,1	10,1	10,7	13,1
C18:1-C18:2	40,1	39,7	41,0	45,3	43,5	53,9	40,9	40,3	40,5	39,6	41,7	42,1	44,2	51,8

3. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado una nueva metodología combinando etanolisis química y extracción con CO₂ supercrítico, que permite el fraccionamiento de los ácidos grasos de la grasa láctea en forma de ésteres etílicos con altos enriquecimientos y rendimientos.
- La transformación de los triglicéridos en sus ésteres etílicos de ácidos grasos permite obtener extractos altamente enriquecido en ácidos grasos de cadena corta y media (hasta un 70%) con buenos rendimientos (más del 80%), empleando condiciones de extracción muy suaves (89 bares y 48 °C). En estas condiciones de extracción, los factores de enriquecimiento para los ésteres etílicos de los ácidos grasos C4 y C6 resultaron ser superiores a 7.
- Con el procedimiento desarrollado, se pueden establecer las condiciones de extracción para fraccionar los ésteres etílicos de determinados ácidos grasos en función de su longitud de cadena variando la densidad del CO₂ supercrítico. De este modo se pueden obtener extractos y fracciones no extraídas con diferentes composiciones y valores nutricionales.
- Esta metodología puede ser utilizada para aislar fracciones enriquecidas en ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media con el objetivo de producir lípidos funcionales.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. **Lock, A. & Bauman, D.**, (2004). *Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health*. *Lipids*, 39(12): p. 1197-1206.
2. **Milner, J.A.**, (1999). *Functional foods and health promotion*. *Journal of Nutrition*, 129: p. 1395S-1397S.
3. **Committee on Opportunities in Agriculture, N.R.C.**, (2003). *Frontiers in Agricultural Research: Food, Health, Environment, and Communities*. Washington, DC.: Nacional Academy Press.
4. **Kaylegian, K.E.**, (1999). *The Production of Specialty Milk Fat Ingredients*. *J. Dairy Sci.*, 82(7): p. 1433-1439.
5. **Augustin, M. & Versteeg, C.**, (2006). *Milk Fat: Physical, Chemical and Enzymatic Modification*, in *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*, S. US, Editor. p. 293-332.
6. **Chen, H., Schwartz, S.J., & Spanos, G.A.**, (1992). *Fractionation of Butter Oil by Supercritical Carbon Dioxide*. *J. Dairy Sci.*, 75(10): p. 2659-2669.
7. **Kaufmann, V.G., Biernoth, G., Frede, E., Merk, W., Precht, D., & Timmen, H.**, (1982). *Fraktionierung von butterfett durch extraktion mit uberkritischem CO₂*. *Milchwissenschaft*, 37: p. 92-96.
8. **Arul, J., Boudreau, A., Makhoul, J., Tardif, R., & Sahasrabudhe, M.R.**, (1987). *Fractionation of Anhydrous Milk Fat by Supercritical Carbon Dioxide*. *Journal of Food Science* 52(5): p. 1231-1236.
9. **Bhaskar, A.R., Rizvi, S.S.H., & Sherbon, J.W.**, (1993). *Anhydrous Milk Fat Fractionation with Continuous Countercurrent Supercritical Carbon Dioxide*. *Journal of Food Science* 58(4): p. 748-752.
10. **Parodi, P.W.**, (1997). *Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents*. *Journal of Nutrition*, 127(6): p. 1055-1060.
11. **Parodi, P.W.**, (2005). *Dairy Product Consumption and the Risk of Breast Cancer*. *J Am Coll Nutr*, 24(suppl_6): p. 556S-568.
12. **Jensen, R.G.**, (2002). *The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000*. *Journal of Dairy Science*, 85(2): p. 295-350.
13. **Yu, Z.-R., Singh, B., Rizvi, S.S.H., & Zollweg, J.A.**, (1994). *Solubilities of fatty acids, fatty acid esters, triglycerides, and fats and oils in supercritical carbon dioxide*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 7(1): p. 51-59.

Capítulo V: Esterificación de fitoesteroles con ácido butírico y distintos ácidos grasos de grasa láctea

1.	INTRODUCCIÓN.....	229
1.1.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	229
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	231
2.1.	MUESTRAS Y REACTIVOS	231
2.2.	REACCIÓN DE SAPONIFICACIÓN DE LA GRASA LÁCTEA	233
2.3.	REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROS	234
2.3.1.	Con los ácidos grasos de la grasa láctea	234
2.3.2.	Con concentrados de AGEE de cadena corta y media	234
2.3.3.	Con tributirina	234
2.3.4.	Con butirato de etilo	235
2.4.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS LIPASAS	235
2.5.	CALCULO DEL PUNTO DE FUSIÓN DE LOS ÉSTERES DE FITOESTEROL CON AGL DE GRASA LÁCTEA.....	235
2.6.	INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA DE CANDIDA RUGOSA	235
2.7.	ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROS CON AGL DE GRASA LÁCTEA POR HPLC	237
2.8.	ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROS CON AGL DE GRASA LÁCTEA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES....	237
2.8.1.	Derivatización en medio ácido	238
2.8.2.	Derivatización en medio básico.....	238
2.9.	ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROS CON AGEE DE CADENA CORTA, MEDIA Y BUTIRATO DE ETILO, POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ON-COLUMN ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS .	238
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	239
3.1.	ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROS CON AGL DE GRASA LÁCTEA.....	239
3.1.1.	Lipasa inmovilizada.....	239
3.1.2.	Evolución temporal de la reacción de esterificación	241
3.1.3.	Estabilidad de las lipasas	245
3.2.	ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROS CON ÉSTERES ETÍlicos DE AGCC Y AGCM DE GRASA LÁCTEA.....	245
3.2.1.	Esterificación de fitoesteros con tributirina	246
3.3.	ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROS CON BUTIRATO DE ETILO.....	252
4.	CONCLUSIONES.....	254
5.	BIBLIOGRAFÍA	256

1. INTRODUCCIÓN

La grasa de la leche contiene varios compuestos que han demostrado tener efectos beneficiosos sobre distintos trastornos relacionados con la salud. Estos efectos se han constatado en modelos animales y en cultivos celulares de humanos y animales [1, 2]. Una de estas sustancias, como ya se expuso en capítulos anteriores, es el ácido linoleico conjugado (CLA), que se encuentra principalmente en carne de vacuno, cordero y productos lácteos.

Parodi [3], por ejemplo, ha escrito numerosos artículos resumiendo el papel de los productos lácteos en la prevención del cáncer, destacando entre los componentes beneficiosos el ácido butírico.

Por otra parte, los beneficios para la salud de los AGCM (C6:0-C12:0) son bien conocidos. Los AGCM son una fuente rápida de energía para los seres humanos, ya que después de la digestión, la mayoría de ellos son transportados directamente al hígado a través de la vena porta para su oxidación, depositándose poco o nada en la grasa corporal [4].

Además, la grasa láctea contiene una proporción significativa de ácido transvaccénico que ha mostrado tener algunas actividades biológicas interesantes en humanos. Un estudio llamado proyecto TRANSFACT fase I comparó los efectos de las fuentes naturales e industriales de isómeros de ácidos grasos trans sobre los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares [5, 6] y encontraron que los AGT industriales tenían efectos negativos sobre los factores de riesgo cardiovascular, mientras que los AGT naturales presentes en productos lácteos no.

1.1. Objetivos y plan de trabajo

Continuando con la línea de investigación sobre esterificación de fitoesteroles en medios sin disolventes, el presente estudio se centra en describir metodologías para producir ésteres de fitosterol con los ácidos grasos de la grasa láctea. En concreto, se usaron los AGL usando la lipasa de *C. rugosa* comercial e inmovilizada, con una metodología similar a la utilizada para esterificar el CLA, prestando especial atención a la temperatura con el fin de acortar los tiempos de reacción. También se ha llevado a

cabo la síntesis de ésteres de fitoesterol utilizando concentrados de ésteres etílicos de AGCC-AGCM obtenidos mediante fraccionamiento supercrítico (capítulo IV) y butirato de etilo. En este caso, además de la lipasa de *C. rugosa*, se estudiaron otras lipasas para llevar a cabo la transesterificación de fitoesteroles.

Las principales ventajas que se esperan de los ésteres de fitoesterol obtenidos son:

- Obtener un producto de fitoesterol más soluble, que puede ser dado en dosis más bajas, manteniendo una alta bio-eficiencia. Además, al incorporar ácidos grasos de cadena corta, los ésteres de fitoesterol producidos son menos apolares y podrían presentar una mayor hidrodispersabilidad [7].

- Obtener un producto que combine los efectos beneficiosos de los fitoesteroles con alguno de los efectos de los ácidos grasos de la grasa láctea en una sola molécula.

Para lograr estos objetivos, se evaluó además la especificidad de sustrato hacia los distintos ácidos grasos (caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y CLA) de las lipasas comerciales e inmovilizadas de *Candida rugosa* en las esterificaciones con grasa láctea. También se investigaron la temperatura, la carga enzimática y la actividad residual de las lipasas.

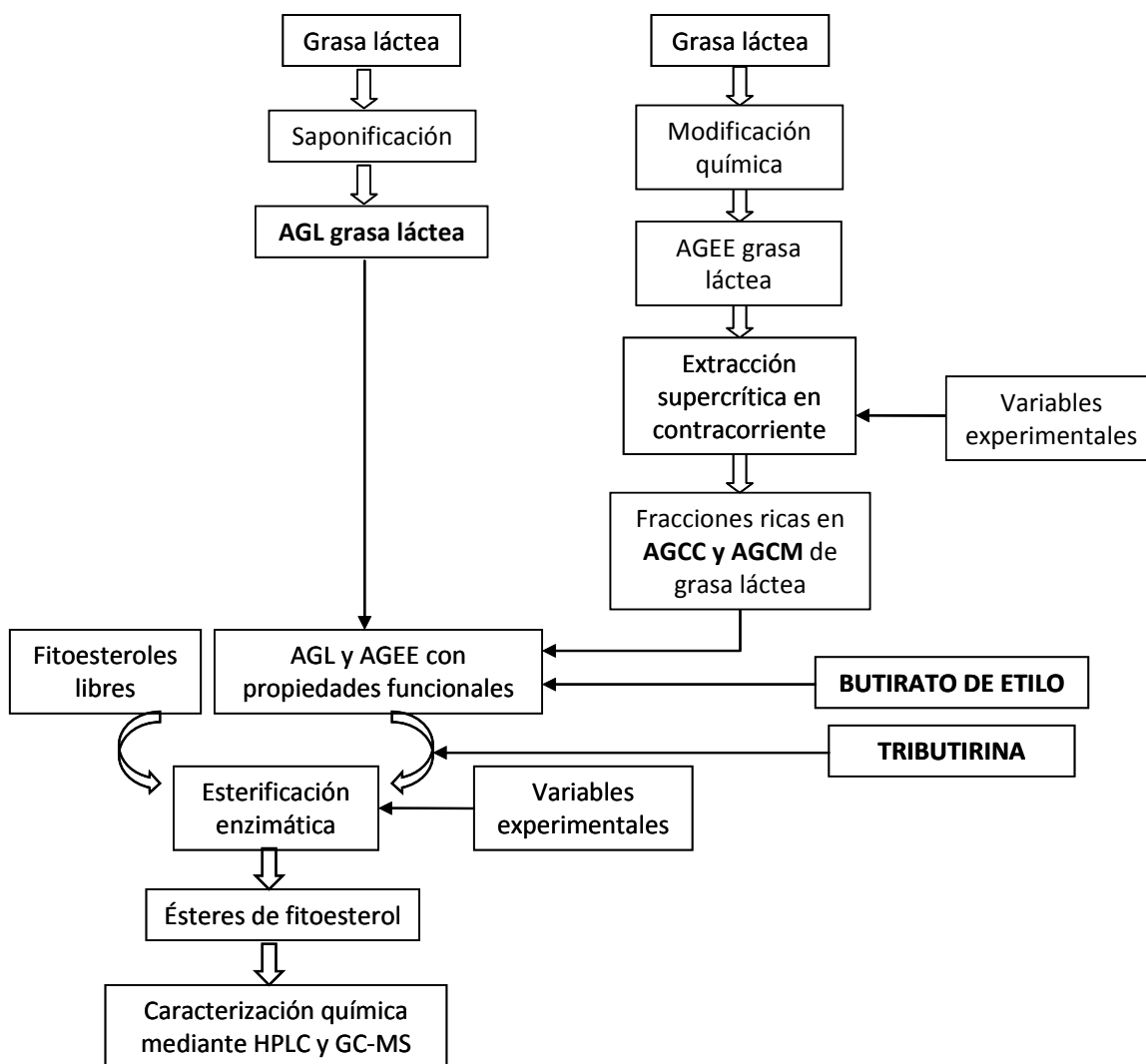


Figura 1. Representación esquemática del proceso propuesto para la obtención de ésteres de fitosterol a partir de los distintos ácidos grasos de la grasa láctea, butirato de etilo y tributirina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

En los procesos de síntesis de ésteres de esteroles ricos en AGL de grasa láctea, AGCC, AGCM y ácido butírico, se utilizaron fitoesteros (cuya composición se detalla en la Tabla 1) que fueron obtenidos de un destilado de desodorización de aceite de girasol de acuerdo con la metodología propuesta por Vázquez y col. [8].

Tabla 1. Porcentajes de los distintos tipos de fitoesteros

	Especificaciones
Brasicasterol	$\leq 5\%$
Campesterol	15-30%
Estigmasterol	15-30%
Beta-sitosterol	$\geq 40\%$
Contenido total de fitoesteros	$\geq 95\%$

La lipasa de *Candida rugosa*, *Pseudomonas* TL y *Alcaligenes* QLC fueron adquiridas a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), así como el octiltrietoxisilano, el acetato de p-Nitrofenilo (pirimifos metil), la glicerina tributirato (tributirina) y el butirato de etilo.

Los concentrados de ésteres etílicos de AGCC y AGCM fueron los obtenidos en el capítulo IV a partir de la grasa láctea donada por Industrias Lácteas Asturianas S.A. (Navia, España). Su composición se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del concentrado de ésteres etílicos de AGCC-AGCM de grasa láctea

Ácidos grasos	% peso
Butírico	21,57
Caproico	19,85
Caprílico	7,83
Cáprico	10,48
Láurico	6,45
Mirístico	10,32
Palmitico	11,87
Estearico	2,07
Oleico	9,35
CLA	0,21

La grasa láctea fue una donación del laboratorio del profesor Dale Bauman. La composición en ácidos grasos de esta grasa láctea se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición en ácidos grasos de la grasa láctea

Ácidos grasos	% peso
Caproico	1.20
Caprílico	0.74
Cáprico	1.92
Láurico	1.99
Mirístico	8.52
Palmitico	20.61
Palmitoleico	1.87
Estearico	11.70
Oleico	45.91
Linoleico	2.52
CLA	2.59

Todos los disolventes utilizados fueron adquiridos a Lab Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda) y todos tenían grado HPLC.

La sílice MS3030 utilizada como soporte para la enzima fue una muestra de regalo de Silica PQ Corporation (Valley Forge, PA. EE.UU.).

2.2. Reacción de saponificación de la grasa láctea

En este proceso se tomó como material de partida la grasa láctea donada por el laboratorio del Dr. Dale Bauman. Se saponificaron 80 g de grasa láctea con 240 ml de NaOH 2.7 mol L^{-1} (55% etanol/45% agua) en un agitador orbital (300 rpm) a 60 °C durante 30 minutos. Posteriormente se utilizó un rotavapor para eliminar el etanol en condiciones de vacío a 60 °C durante 15 minutos. A continuación se añadió el mismo peso de etanol evaporado como agua. Esta solución se sometió a vacío en un rotavapor a 60 °C durante 20 minutos. Después de este tiempo se añadió agua fría (mismo peso que el agua evaporada) y una solución de ácido sulfúrico (20% v/v). Se agitó y se formaron dos fases. Se recuperó la fase superior (fase que contiene los ácidos grasos libres) y se lavó con una disolución de NaCl 0.5 mol L^{-1} . Por último, el producto final se secó con sulfato sódico anhidro. Estos AGL se utilizaron como sustrato de la reacción de esterificación.

2.3. Reacción de esterificación de los fitoesteros

2.3.1. Con los ácidos grasos de la grasa láctea

En estas reacciones se siguió una metodología similar a la esterificación de fitoesteros con CLA. Se mezclaron cantidades equimoleculares (relación 1:1) o casi equimoleculares (1:0,93) de los sustratos de partida (fitoesteros de girasol y ácidos grasos libres de grasa láctea) y un 7 % de hexadecano como patrón interno. Se estudió la adición en etapas de la carga de fitoesteros, aunque en el proceso final la adición de los FT se realizó en 2 etapas. En la primera etapa se mezclaron 1,5 g (5,57 mmol) de AGL de grasa láctea y 0,7 g (1,72 mmol) de fitoesteros. La mezcla resultante se incubó con la lipasa de *C. rugosa* comercial e inmovilizada (5 - 10% p/p) en un agitador orbital (200 rpm) a temperaturas entre 40 y 50 °C. Tras 3-5 horas de reacción, se añadieron 1,4 g de fitoesteros (3,44 mmol) y la mezcla se agitó a vacío (100 mbares) en un rotavapor. Se recogieron muestras de 50 µl periódicamente, que se disolvieron en 1 ml de hexano: etanol: metil tercbutil eter (5:5:1). El tiempo de las reacciones fue de entre 9 y 48 h. Las muestras fueron analizadas por HPLC y cromatografía de gases.

2.3.2. Con concentrados de AGEE de cadena corta y media

Un exceso de los concentrados de ésteres etílicos de AGCC y AGCM obtenidos en el capítulo IV se mezclaron con fitoesteros, con una proporción de 5:1. Se añadió un 7% de escualeno como patrón interno. La mezcla resultante se incubó con la lipasa de *Pseudomonas* TL (10% p/p) en un rotavapor (200 rpm) a vacío (350 mbares) y 60 °C. Se recogieron muestras de 50 µl periódicamente, que se disolvieron en 1 ml de cloroformo. El tiempo de las reacciones fue de entre 8 y 24 h. Las muestras fueron analizadas por GC-MS.

2.3.3. Con tributirina

Un exceso de tributirina se mezcló con fitoesteros en una proporción de entre 3:1 y 5:1. También se añadió un 7% de escualeno como patrón interno. La mezcla resultante se incubó con la lipasa de *C. rugosa* (10% p/p) en un agitador orbital (200 rpm) a temperaturas entre 50 y 60 °C y/o en un rotavapor (200 rpm) en las reacciones con vacío (100-350 mbares). Se recogieron muestras de 50 µl periódicamente, que se

disolvieron en 1 ml de cloroformo. El tiempo de las reacciones fue de entre 8 y 24 h. Las muestras fueron analizadas por GC-MS.

2.3.4. Con butirato de etilo

Un exceso de butirato de etilo se mezcló con fitosteros en una proporción de 5:1. También se añadió un 7% de escualeno como patrón interno. La mezcla resultante se incubó con la lipasa de *Pseudomonas* TL (10% p/p) en un rotavapor (200 rpm) a vacío (350 mbares) y 60 °C. Se recogieron muestras de 50 µl periódicamente, que se disolvieron en 1 ml de cloroformo. El tiempo de las reacciones fue de 8 h. Las muestras fueron analizadas por GC-MS.

2.4. Estudio de la estabilidad de las lipasas

La metodología empleada para calcular la actividad residual de la lipasa tras los ciclos de reacción fue la descrita en el capítulo II.

2.5. Calculo del punto de fusión de los ésteres de fitoesterol con AGL de grasa láctea

Se introdujeron 200 µl de los ésteres de fitoesterol fundidos en un capilar de vidrio. Posteriormente este capilar se enfrió en una nevera hasta que se observó la solidificación de los EF. El capilar se fue calentando grado a grado hasta que se observó que el producto se empezaba a fundir, parando el aumento de temperatura cuando el producto presentó un aspecto transparente. Este intervalo de temperaturas dio como resultado un intervalo de fusión, ya que el producto está formado por varios ésteres de fitoesterol diferentes según el AGL esterificado.

2.6. Inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*

El protocolo de inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* fue muy similar al descrito previamente por Blanco R. M. y col. para la lipasa de la *Candida antarctica* [9]. La sílice MS 3030 se funcionalizó mediante una reacción con octiltrietoxisilano en tolueno, utilizándose el derivado octil-sílice resultante como portador para la enzima. La solución enzimática fue preparada por la suspensión de 200, 400, 1000, 2000 o 4000 mg de polvo de enzima comercial en 40 ml de fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. Las suspensiones se mantuvieron bajo fuerte agitación magnética durante 3 horas y

posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 113,57 x g. Se realizó un análisis de Bradford del sobrenadante de la centrifugación, revelando que el contenido de proteína del extracto sólido era del 4%.

Las diferentes isoformas de la lipasa de *C. rugosa* pueden ser eficientemente absorbidas usando estos grupos octilo (altamente hidrofóbicos) como soportes [10]. En este caso, para fijar la enzima al soporte se añadieron 100 mg de octil-sílice, previamente mojada con 1 ml de etanol, a 20 ml de los sobrenadantes. Se cogieron alícuotas de las suspensiones y los sobrenadantes periódicamente, y sus actividades se determinaron mediante el análisis espectrofotométrico de la hidrólisis de pNPA en un espectrofotómetro Kontron (Watford, Herts, Reino Unido) a 348 nm. Este equipo tiene un dispositivo de agitación y la capacidad de mantener la temperatura constante. La pérdida total de actividad o valores constantes en la actividad del sobrenadante fue el indicativo de que la mayor parte de la enzima se había fijado al soporte, pudiéndose finalizar el proceso. Las suspensiones se filtraron a continuación, se lavaron con fosfato de sodio 200 mM pH 7,0 y se secaron con acetona. A continuación, el inmovilizado final se secó a vacío durante 30 minutos.

Para determinar la actividad catalítica de la lipasa inmovilizada se usó como parámetro la actividad en hidrólisis de tributirina. Dicho método está basado en la liberación de ácido butírico que tiene lugar al poner en contacto tributirina y la enzima. Para monitorizar estas reacciones usamos un pHstato Mettler Toledo DL-50. Se realiza la reacción en una disolución débilmente tamponada a pH 7, y la labor del pHstato es mantener el pH en este valor. Para ello, a medida que se va dando la reacción y se libera ácido butírico, el pH comienza a bajar. El aparato va liberando el volumen de NaOH 0,1M necesario para mantener neutro el pH.

El procedimiento experimental llevado a cabo en cada reacción fue el siguiente: en un vaso se vertieron 50 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7 y 1,47 ml de tributirina en agitación. A continuación se introdujo una masa de catalizador conocida. La velocidad de adición de NaOH (ml/min) para mantener el pH en un valor de 7 nos dio la velocidad de reacción y por tanto la actividad de la enzima (Figura 2).

Las unidades de tributirina (U_{TB}) se calculan a partir de la siguiente fórmula:

$$U_{TB} = \frac{ml\ NaOH / min \cdot 100 \mu mol / ml}{g\ catalizador}$$

En las condiciones anteriormente descritas se prepararon un total de 2 gramos de catalizador con 400 mg de proteína por gramo de sílice.

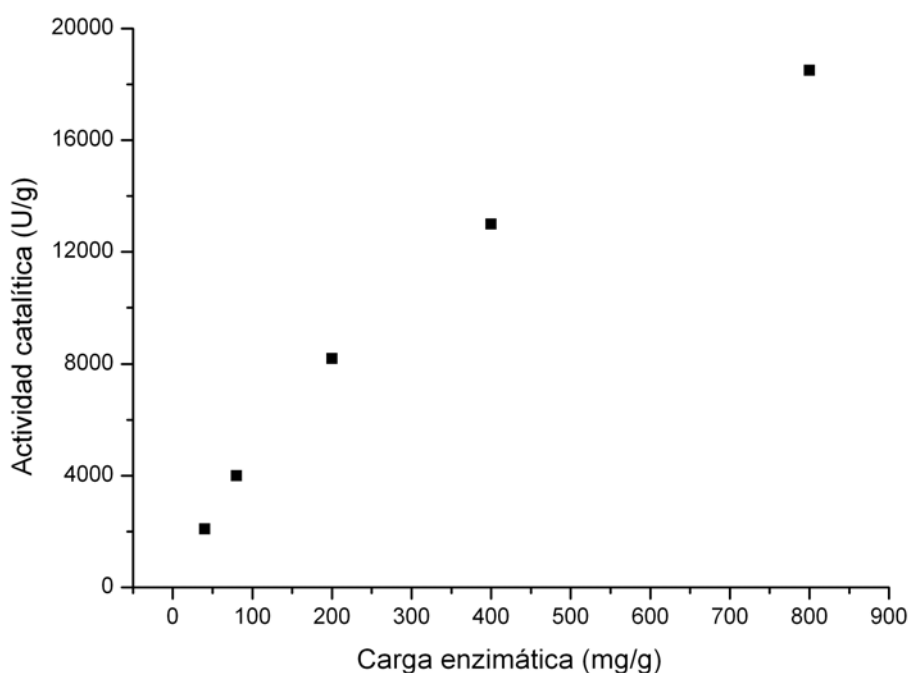


Figura 2. Actividad catalítica de la enzima inmovilizada

2.7. Análisis de los productos de la reacción de esterificación de fitoesteros con AGL de grasa láctea por HPLC

Tanto el equipamiento de HPLC, como la metodología de análisis empleada fueron las descritas en el capítulo II.

2.8. Análisis de los productos de la reacción de esterificación de fitoesteros con AGL de grasa láctea por cromatografía de gases

Tanto el equipamiento de GC, como la metodología de análisis empleada fueron las descritas en el apartado “Análisis de AGEe por cromatografía de gases” del capítulo II.

Para el análisis de los productos de esta reacción por GC se tuvieron que modificar previamente las alícuotas mediante dos tipos de transmetilaciones:

2.8.1. Derivatización en medio ácido

Se llevo a cabo una transmetilación que transformó todos los ácidos grasos de la muestra (libres y esterificados) en sus correspondientes ésteres metílicos (AGME). Para ello, a 250 μ l de la disolución de la muestra se le adicionó 1 ml de HCl 0,2 M en metanol. Esta mezcla se mantuvo a 60 °C durante 4 h. Después de la adición de 200 μ l de agua, la mezcla fue sometida a 2 procesos de extracción con 1 ml de hexano, secado con sulfato de sodio anhidro y centrifugación.

2.8.2. Derivatización en medio básico

Las muestras también se transesterificaron en medio básico para transformar sólo los ácidos grasos esterificados en sus correspondientes AGME. De este modo, a 250 μ l de la disolución de la muestra, se le adicionó 1 ml de NaOH 0,1 M en metanol. Esta mezcla se mantuvo a 60 °C durante 30 min. Después de la adición de 200 μ l de agua, la mezcla fue sometida a 2 procesos de extracción con 1 ml de hexano, secado con sulfato de sodio anhidro y centrifugación.

Por diferencia entre el total de los ácidos grasos y los ácidos grasos esterificados a los distintos tiempos de reacción, fue posible conocer el consumo de ácido graso libre que tuvo lugar en el transcurso de la reacción.

2.9. Análisis de los productos de la reacción de esterificación de fitoesteroles con AGEE de cadena corta, media y butirato de etilo, por cromatografía de gases on-column acoplada a un detector de masas

Un cromatógrafo de gases (6890N Network GC System) con inyector automático (Agilent 7683B) con inyección on-column, acoplado a un detector de masas (Agilent 5975C MSD inerte, tipo cuadrupolo) fue utilizado en los análisis. Se utilizó una columna capilar de 7 metros y 0.25 μ m de diámetro interno (5% fenil metil silicona, Quadrex Corporation, New Haven, CT). Este equipo se utilizó para analizar los

productos de la reacción de esterificación de fitoesteroides con ácido butírico. Se inyectó 0,5 µl de una disolución de la muestra y se cuantificó usando el detector FID del GC. El detector de masas se utilizó para identificar los productos.

El método utilizado ha sido previamente descrito en el capítulo IV para el cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II con inyección on-column.

Las muestras analizadas tenían escualeno como patrón interno (ya que otros patrones como el hexadecano o el dodecano se solapaban con productos de la reacción) y se diluyeron a una concentración de 1-2 mg/ml para su análisis por GC-MS

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Esterificación de fitoesteroides con AGL de grasa láctea

3.1.1. Lipasa inmovilizada

Se prepararon inmovilizados con cargas enzimáticas entre 40 y 800 mg de proteína por gramo de sílice y se midieron sus actividades hidrolíticas en ausencia de limitaciones difusionales como se describe en el apartado "Métodos". Como se muestra en la Figura 2, la relación entre la carga de enzima y la actividad catalítica fue lineal hasta 400 mg/g. A partir de este valor, el aumento del contenido de proteína no fue acompañado de un aumento proporcional en la actividad, lo que podría indicar que el enzima se había inmovilizando en varias capas.

Por lo tanto, este valor de 400 mg/g se consideró la carga óptima para el catalizador y fue la utilizada en este trabajo. Este valor de carga enzimática tan elevado se pudo lograr debido a las características morfológicas de la matriz de sílice utilizada: gran superficie (300 m²/g) y tamaño de poro ancho (un diámetro de poro promedio de 27,9 nm). Así, 1 gramo del catalizador inmovilizado tenía mayor actividad que la misma cantidad del extracto enzimático comercial, por lo que se esperaba que mejorase la cinética de la reacción.

Las constantes de especificidad, calculadas según el método de Rangheard y col. [11], se muestran en la Tabla 4, así como la composición en ácidos grasos (% en peso) de la mezcla inicial de AGL de la grasa láctea.

Tabla 4. Constantes de especificidad para los diferentes ácidos grasos de grasa láctea en la esterificación de fitoesteroles catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*. Ambas reacciones se llevaron a cabo a 50 °C con un 10% (p/p) de la enzima comercial e inmovilizada.

Ácidos grasos	Grasa láctea (% en peso)	Constantes de especificidad			
		Lipasa comercial		Lipasa inmovilizada	
		0.66 h	2 h	0.33 h	0.66 h
Ácido caproico	1.20	1.30	1.96	1.30	1.59
Ácido caprílico	0.74	0.66	0.72	0.67	0.71
Ácido cáprico	1.92	0.62	0.57	0.46	0.52
Ácido láurico	1.99	0.74	0.76	0.71	0.70
Ácido mirístico	8.52	1.41	1.27	1.19	1.03
Ácido palmítico	20.61	1.19	1.02	0.83	0.81
Ácido palmitoleico	1.87	0.66	0.59	0.35	0.57
Ácido esteárico	11.70	0.81	0.92	0.99	0.96
Ácido oleico	45.91	1.00	1.00	1.00	1.00
Ácido linoleico	2.52	0.25	0.34	0.27	0.34
CLA	2.59	0.26	0.29	0.26	0.34

Los **factores de competitividad (α)** de los ácidos grasos de interés se calcularon a partir de la Ecuación 1 usando la concentración de sustrato inicial y las concentraciones de sustrato en dos tiempos de reacción diferentes.

$$\alpha = [\log(FA1_0 / FA1_t)] / \log(FA2_0 / FA2_t) \quad \text{Ecuación 1}$$

FA1 y FA2 son las concentraciones de los ácidos grasos de interés y el ácido graso de referencia (en este caso el ácido oleico), respectivamente. Los subíndices 0 y t se refieren al valor inicial y al valor en el tiempo t, respectivamente. La constantes de especificidad se calculan como $(1/\alpha)$ y su valor tiene significado en relación con la

constante de especificidad de 1,0 que se le asigna al ácido graso presente en la concentración más alta (en este caso el ácido oleico). Un valor de la constante de especificidad superior a 1 indica una mayor especificidad o afinidad de la lipasa hacia ese ácido graso en particular, con respecto al ácido graso presente en mayor concentración, por lo que preferirá esterificar dicho ácido graso con el fitoesterol.

Atendiendo a los datos de la Tabla 4, la mayor discriminación de la lipasa se observó para los ácidos grasos linoleico y CLA ($\approx 0,3$). Cabe destacar una moderada selectividad hacia el ácido caproico, aunque esta selectividad no se observó hacia los demás AGCM. Como se puede ver, se obtuvieron coeficientes similares para cada uno de los ácidos grasos, tanto con la lipasa comercial como con la lipasa inmovilizada, lo cual indica que el soporte no tiene ningún efecto sobre la especificidad de la lipasa por los diferentes ácidos grasos.

3.1.2. Evolución temporal de la reacción de esterificación

La reacción de esterificación entre los AGL de la grasa láctea y los fitoesteros se llevó a cabo a 40 °C con un 10 % (p/p) de la lipasa comercial no inmovilizada, en dos etapas consecutivas (misma metodología que con el CLA, capítulo III), alcanzando un rendimiento final en ésteres de fitoesterol del 83% en 96 horas. El mismo procedimiento se utilizó con la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada, pero durante la primera etapa (con un 33% en peso de fitoesterol añadido) se observó que la mezcla de reacción tenía una elevada viscosidad, por lo que se descartó añadir la segunda carga de fitoesteros, ya que era imposible conseguir un medio fluido y homogéneo. A pesar de ello, los datos obtenidos a partir de la primera etapa de la reacción (primeras 5 horas a presión atmosférica) muestra claramente que la lipasa inmovilizada tiene más actividad, alcanzando el equilibrio de la reacción en aproximadamente 2 horas (Figura 3).

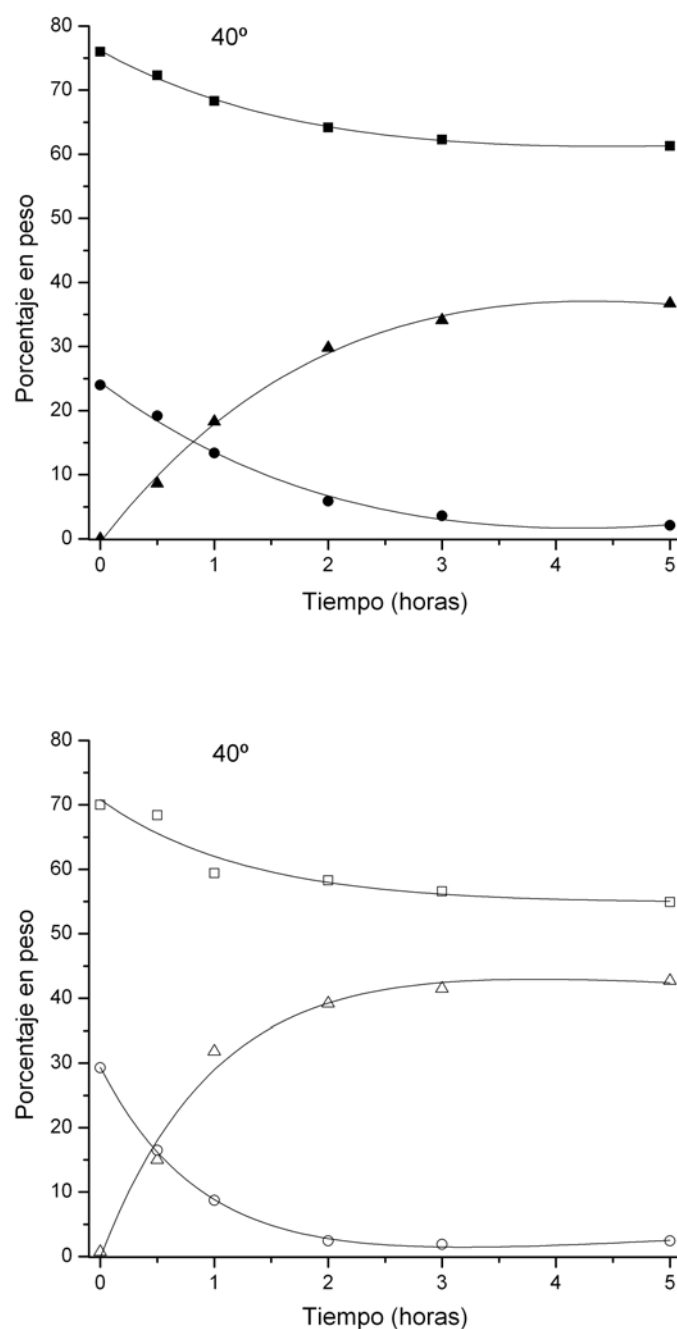


Figura 3. Comparativa entre la esterificación de fitoesteros con AGL de grasa láctea catalizada por la lipasa de *C. rugosa* comercial e inmovilizada. Condiciones de reacción: 10 % (p/p) de lipasa y 40 °C. Símbolos: Lipasa comercial ▲ ésteres de esterol; ■ AGL de grasa láctea; ● fitoesteros; Lipasa inmovilizada: △ ésteres de esterol; □ AGL de grasa láctea; ○ fitoesteros.

Para resolver el problema de la elevada viscosidad después de la adición de la segunda carga de fitoesteros, la reacción de esterificación con la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada se llevó a cabo sólo con el 5% (p/p) de lipasa. En estas condiciones (los datos no se muestran) se alcanzaron un 79% (p/p) de ésteres de fitosterol después de

144 horas. Incluso con la adición de sólo un 5% en peso de la lipasa, se siguió observando una alta viscosidad de la mezcla de reacción. Esto, junto con los elevados tiempos de reacción, obligó a descartar la utilización de un 5% (p/p) de lipasa como solución al problema de la elevada viscosidad.

Se pensó en otras alternativas para reducir la viscosidad de la mezcla de reacción e incrementar la velocidad de la reacción. Una de ellas fue llevar a cabo la reacción de esterificación a 50 °C. En estas condiciones, el 94% y 99% (p/p) de ésteres de fitoesterol se obtuvieron en 48 horas y 9 horas con la lipasa comercial y la lipasa inmovilizada, respectivamente (ver Figura 4 y Figura 5). Estos resultados indican que el aumento de 10 grados en la temperatura mejora claramente la velocidad de esterificación. Además, en el caso de la lipasa inmovilizada no sólo se mejora la velocidad de reacción, sino que también mejora significativamente la conversión de los sustratos en las dos etapas.

Cabe señalar que, durante la primera etapa, los fitoesteroles se consumieron en sólo una hora, lo que indica que se podrían conseguir tiempos de reacción más cortos si esta primera etapa se limitase a 1 hora. Este hecho es muy importante desde el punto de vista de la reutilización de la lipasa inmovilizada, debido a que la pérdida neta de actividad de la lipasa sería menor en cada etapa y se podrían llevar a cabo un mayor número de reacciones utilizando el mismo biocatalizador inmovilizado.

Con el fin de esclarecer la solidificación de la mezcla de reacción con el paso del tiempo, se calculó el punto de fusión de los ésteres de fitoesterol con AGL de grasa láctea. Se obtuvo un intervalo de fusión (el producto está formado por varios ésteres de fitoesterol diferentes según el AGL esterificado) de 47-52 °C. Este resultado indica porque a 40 °C la solubilización de los ésteres de fitoesterol en la mezcla de reacción no pudo ser completa y, por tanto, explica la acumulación de material sólido con el transcurso de la reacción. Al realizar el proceso a 50 °C se favorece que el producto final que se va formando se mantenga en estado líquido y contribuya a la fluidez de la mezcla de reacción.

Por todas estas razones, parece ser más conveniente llevar a cabo la esterificación de los fitoesteroles con los AGL de grasa láctea a 50 °C, para evitar la acumulación de material sólido en el transcurso de la reacción y usando un 10% p/p de

la lipasa para lograr el equilibrio de reacción en el período de tiempo más breve posible (aprox. 48 horas en el caso del enzima comercial).

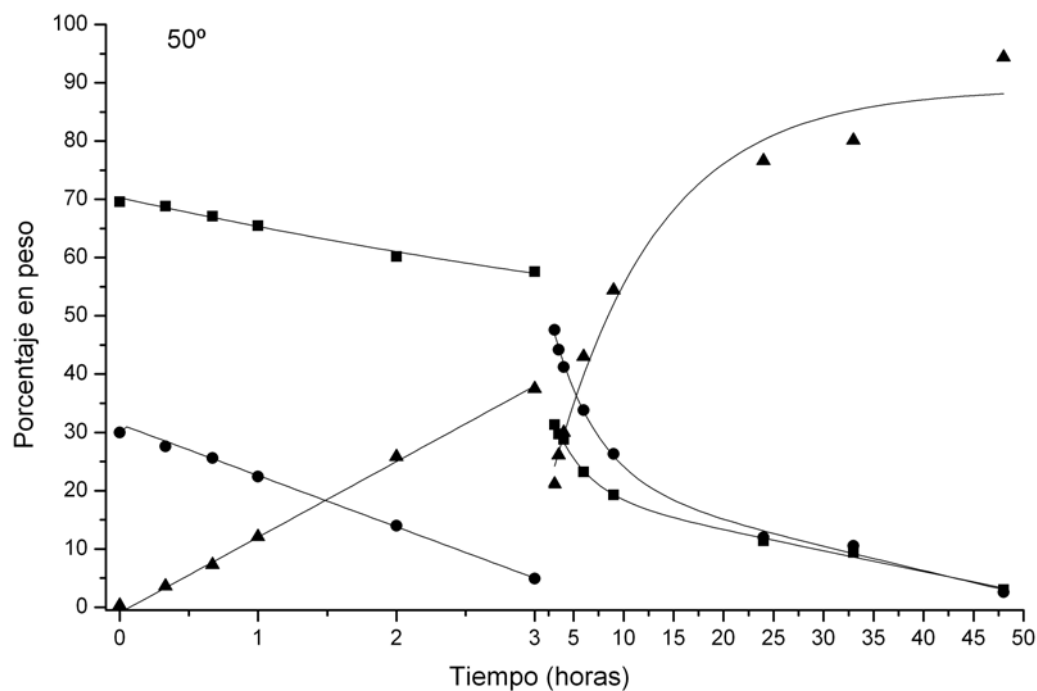


Figura 4. Lipasa comercial. Adición de los fitoesteros en dos etapas, la segunda a vacío (100 mbares). ▲ ésteres de fitosterol; ■ AGL de grasa láctea; ● fitoesteros

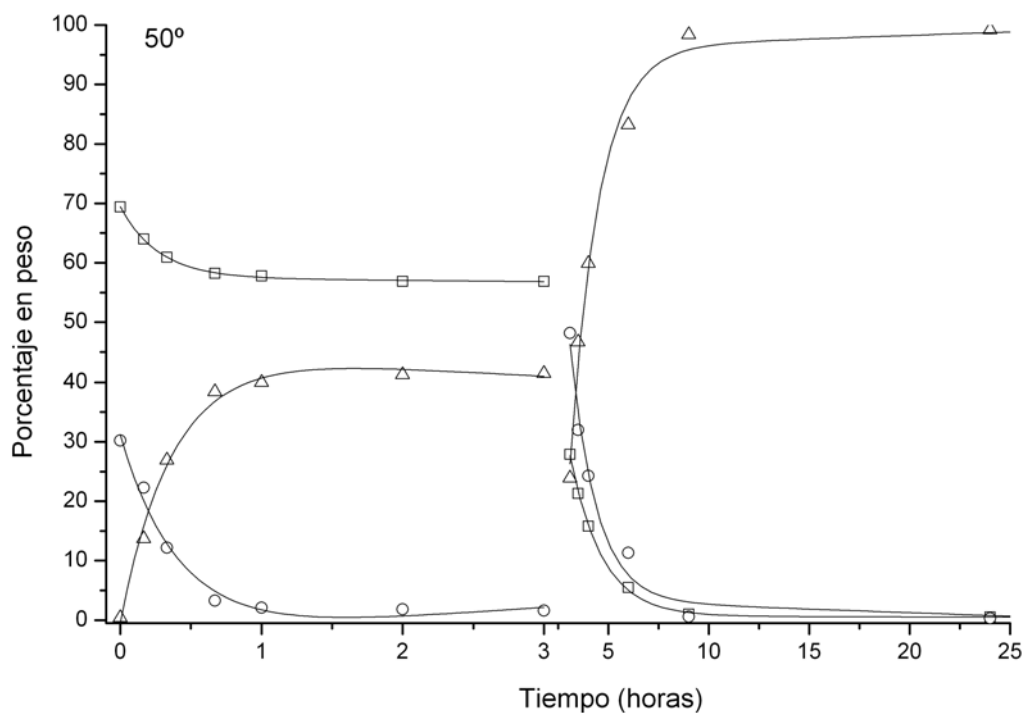


Figura 5. Lipasa inmovilizada. Adición de los fitoesteros en dos etapas, la segunda a vacío (100 mbares). △ ésteres de fitosterol; □ AGL de grasa láctea; ○ fitoesteros

3.1.3. Estabilidad de las lipasas

Se calculó la actividad residual de la lipasa comercial e inmovilizada a diferentes temperaturas mediante la recuperación del biocatalizador una vez terminada la reacción, de acuerdo con el protocolo descrito en la sección “Estudio de la estabilidad enzimática” (capítulo II).

La lipasa comercial a 40 °C después de 100 horas conservaba una actividad residual del 35%, mientras que después de 48 horas a 50 °C mantenía una actividad residual de 61%. Por su parte, la lipasa inmovilizada a 40 °C después de 96 horas conservaba una actividad residual del 57%, mientras que a 50 °C después de 33 horas su actividad residual era del 77%. Estos resultados indican tasas similares de inactivación de la lipasa comercial e inmovilizada, aunque la lipasa inmovilizada mostró una estabilidad ligeramente superior.

Teniendo en cuenta que los tiempos del proceso se pueden acortar sensiblemente en el caso de la lipasa inmovilizada hasta las 9 horas, se puede afirmar que, aunque el biocatalizador inmovilizado tenga un precio superior, presenta la ventaja de poder reutilizar la misma cantidad de lipasa en numerosos ciclos consecutivos debido a su mayor estabilidad, amén de la ventaja de poder recuperarse más fácilmente de la mezcla final debido a su mayor tamaño de partícula.

3.2. Esterificación de fitoesteroles con ésteres etílicos de AGCC y AGCM de grasa láctea

En esta parte del trabajo se utilizó como material de partida los concentrados de ésteres etílicos de AGCC y AGCM obtenidos mediante el fraccionamiento con fluidos supercríticos de la grasa láctea (capítulo IV). El objetivo era obtener fitoesteroles con ácidos grasos de cadena corta y media que, además de tener la capacidad de reducir los niveles de colesterol y tener una mayor solubilidad en diversas matrices alimentarias (mejorada hidrodispersabilidad en el caso de ácidos grasos de cadena corta), sirviesen para aumentar la vida media en el organismo de estos ácidos grasos, pudiendo llegar con una concentración efectiva al interior de la célula sin ser metabolizados para obtener energía antes, permitiendo ejercer los efectos saludables descritos en los estudios con modelos animales y con células in vitro.

El problema con que nos encontramos es que la lipasa de *C. rugosa* no esterificaba los fitoesteros con AGEE. Se realizaron pruebas con butirato de etilo como ácido graso de cadena corta, usando un exceso de AGEE de entre 3:1 y 5:1, ya que al tener el butirato de etilo un bajo PM, el volumen de AGEE resultante de hacer una proporción equimolecular no era suficiente para poder solubilizar los fitoesteros. Las pruebas se llevaron a cabo a temperaturas entre 40 y 50 °C con un 10 % (p/p) de lipasa de *C. rugosa*. Mediante el uso de esta estrategia la reacción no tuvo lugar. La lipasa QLC de *Alcaligenes sp.*, también fue probada sin obtener resultados positivos.

Se cambió de estrategia, realizando diversas pruebas con ácido butírico puro (ácido graso libre), aunque en estos casos la reacción tampoco progresó (solo se consumió un 1% de fitosteros). Como posible explicación, se pensó que tal vez el ácido butírico puro afectaba negativamente a la actividad de la lipasa de *C. rugosa* o tenía un efecto inhibitorio sobre la enzima. Para comprobar esto último, también se probó la reacción de esterificación usando ácido butírico y ácido oleico con una relación molar entre ellos de 1:1, y una relación molar ácido graso-fitoesterol de 3:1, observándose que se producía una lenta esterificación de los FT con el ácido oleico, mientras que el porcentaje de ácido butírico permanecía inalterado, consumiéndose solo el 50% de los FT. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la lipasa de *C. rugosa* no reconoce eficazmente al ácido butírico como sustrato.

3.2.1. Esterificación de fitoesteros con tributirina

Siguiendo con la lipasa de *C. rugosa* se planteó la estrategia de realizar una transesterificación entre un triglicérido con ácidos grasos de cadena corta, la tributirina, y los fitoesteros. Para ello se llevo a cabo una reacción a pequeña escala usando una relación molar tributirina: fitoesterol de 3:1 (ya que, al igual que en el caso de la esterificación con AGEE, el volumen de tributirina resultante de hacer una proporción equimolecular no era suficiente para poder solubilizar los fitoesteros), 50 °C, 10 % (p/p) de *C. rugosa* y un tiempo de 3 horas. En estas condiciones se consumieron el total de los fitoesteros añadidos, obteniendo un 43 % de ésteres de fitoesterol con ácido butírico, aunque el producto final presentó una elevada viscosidad.

Para intentar reducir la viscosidad del producto final y aumentar la tasa de esterificación, se probaron excesos molares de entre 4:1 (tributirina: fitoesterol) a 5:1,

temperaturas de entre 50 y 60 °C, adición en etapas de los fitoesteros y el uso de vacío (entre 100 y 350 mbar). En ninguna de estas pruebas se obtuvieron mejores resultados que en las condiciones descritas anteriormente, siendo las condiciones óptimas una relación molar de 3:1, 50 °C, un 10% (p/p) de *C. rugosa* y la ausencia de vacío (Figura 6). Se consiguió consumir el total de los fitoesteros libres en 3 horas, obteniéndose un 45 % de ésteres de fitoesterol con butírico. El mayor problema de esta metodología radica en que al final del proceso quedan más de un 50 % de glicéridos (TAG, DAG y MAG) junto al producto de interés, lo cual hace necesario un proceso de separación complejo y hace menos viable esta metodología.

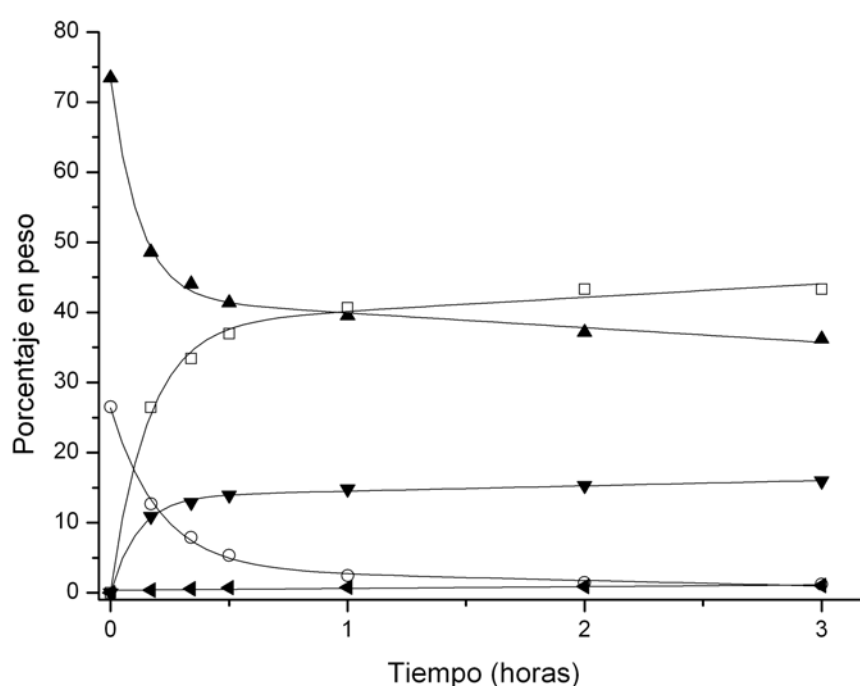


Figura 6. Transesterificación de fitoesteros con tributirina catalizada por la lipasa de *C. rugosa*. Símbolos: ▲ tributirina; ▼ dibutirina; ◄ monobutirina; ○ fitoesteros; □ ésteres de fitoesterol con ácido butírico.

A la vista de la imposibilidad de transesterificar directamente los fitoesteros con los AGEs en presencia de la lipasa de *C. rugosa*, se intentó encontrar una enzima que catalizase una transesterificación entre fitoesteros y ésteres etílicos de ácidos grasos. Un trabajo publicado previamente por Martínez y col. describe un screening de hasta 18 lipasas, tanto libres como inmovilizadas, con el objetivo de transesterificar fitoesteros de madera con ésteres metílicos de ácidos grasos (AGME) de girasol [12]. En este estudio la lipasa que dio los mejores resultados fue la de *Pseudomonas* TL,

consiguiendo una conversión del 95 % en 8 horas, con un 10 % de carga enzimática y 2 mbares de vacío.

Se realizaron pruebas con esta enzima para llevar a cabo la transesterificación entre fitoesteros y ésteres etílicos de ácidos grasos. La utilización en nuestro estudio de ésteres etílicos de AGCC hizo descartar en un principio el uso de un elevado vacío (2 mbares), ya que en estas condiciones estos ácidos grasos son destilados, lo que produce una pérdida de reactivo rápida a medida que avanza la reacción enzimática. Por este motivo se hicieron pruebas sin vacío (ver Figura 7), pero se constató, al igual que en el trabajo citado anteriormente, que para conseguir el consumo del total de los fitoesteros era indispensable realizar la reacción a vacío para eliminar el etanol que se va formando en la reacción, el cual al acumularse, detiene la reacción, no sólo por ser un producto de la misma, sino también por su efecto negativo sobre la actividad de la lipasa a una temperatura de 60 °C.

El mejor resultado, en las pruebas sin vacío, se obtuvo a 60 °C, con una proporción de AGEE y fitoesteros de 5:1 y un 10 % de carga enzimática. La reacción alcanzó el equilibrio a las 2 horas, quedando sin consumirse un 7 % de fitosteros (Figura 7) y obteniéndose un 25% de ésteres de fitoesterol.

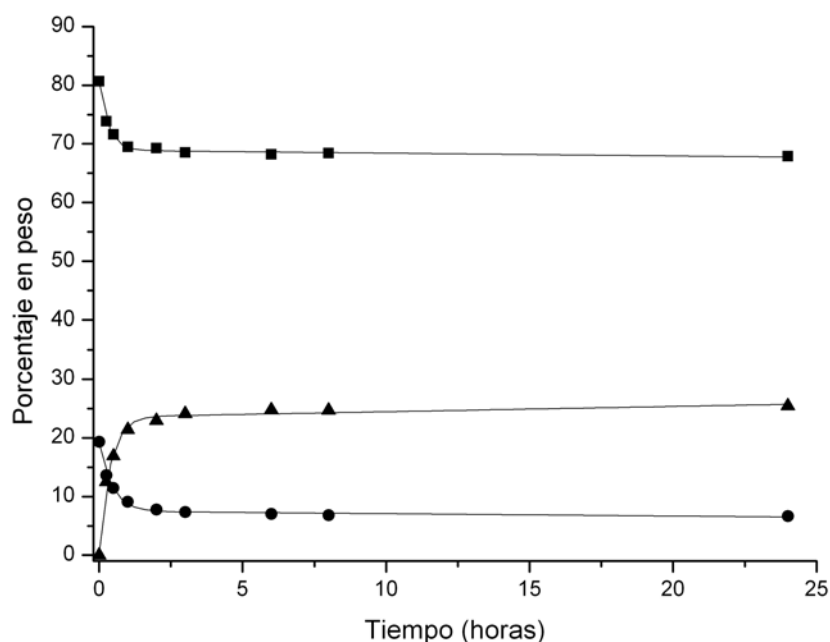


Figura 7. Esterificación de fitoesteros con ésteres etílicos de AGCC y AGCM de grasa láctea con la lipasa de *Pseudomonas* TL sin vacío. Símbolos: ■ AGEE; ● Fitoesteros libres; ▲ Ésteres de fitoesterol

Ante la necesidad de hacer vacío para conseguir una esterificación completa, se probaron condiciones de vacío de entre 100 y 400 mbares, lejos del óptimo de 2 mbares reportado por Martínez y col., para evitar en lo posible la destilación de los AGEE de cadena más corta, como el butirato de etilo o el caproato de etilo.

Se hicieron pruebas manteniendo la proporción de 5:1 (AGEE : fitoesteroles), no solo para seguir disolviendo perfectamente los fitoesteroles en los AGEE, sino en este caso también para compensar los AGEE que se pierden por destilación en la reacción a vacío. Esta pérdida de AGEE se fue calculando durante cada toma de muestra por la diferencia de pesos del vial en el que se hizo la reacción. A 60 °C, con un 10 % (p/p) de carga enzimática y un vacío moderado (350 mbares), se consiguió consumir el total de los fitoesteroles en solo 3 horas (ver Figura 8), obteniendo un 40 % de ésteres de fitoesterol. A partir de la tercera hora, el descenso de los AGEE se atribuye a la destilación por el vacío, observándose el correspondiente incremento en el porcentaje de ésteres de fitoesterol.

La ventaja de este proceso frente a la transesterificación con triglicéridos, es que el exceso de AGEE se puede eliminar fácilmente por destilación aumentando simplemente el vacío. Cabe destacar que otras tecnologías, como la destilación molecular o los fluidos supercríticos, podrían ser también utilizadas para este fin.

El seguimiento de la pérdida de peso por la destilación a 350 mbares de los AGEE a lo largo de la reacción dio como resultado pérdidas de hasta 200 mg/h en las primeras horas, observándose un descenso en la pérdida de peso a medida que avanzaba la reacción, hasta 100 mg/h.

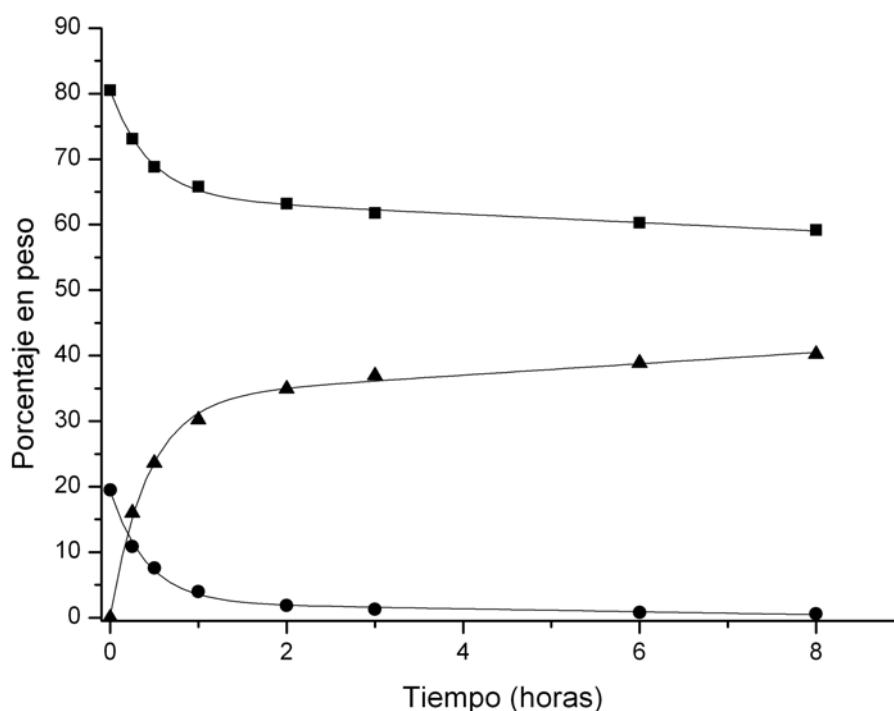


Figura 8. Esterificación de fitoesteros con ésteres etílicos de AGCC y AGCM de grasa láctea con la lipasa de *Pseudomonas* TL con vacío (350 mbares). Símbolos: ■ AGEE; ● Fitoesteros libres; ▲ Ésteres de fitoesterol

Por último se representa como varían los distintos AGEE de manera individual con el transcurso de la reacción, para observar, por un lado, si la lipasa de *Pseudomonas* TL era más específica en la esterificación de algún AGEE en concreto (Figura 9), y por otro, como afectaba el vacío a los AGEE de cadena más corta (Figura 10).

Además, se calcularon las constantes de especificidad para los distintos ácidos grasos en la reacción sin vacío, usando la misma metodología que para la lipasa de *C. rugosa* (Ecuación 1, pág. 240). Como ácido graso de referencia se usó el ácido butírico (el mayoritario en este caso), pero también el ácido oleico (para poder comparar los valores con los obtenidos con *C. rugosa*). En ambos casos, se observó una especificidad para la mayoría de los ácidos grasos similar a la de los ácidos grasos de referencia (valores próximos a 1), excepto para el ácido mirístico que presentó valores superiores a 3, lo que indica una mayor especificidad de esta lipasa de *Pseudomonas* TL hacia este ácido graso.

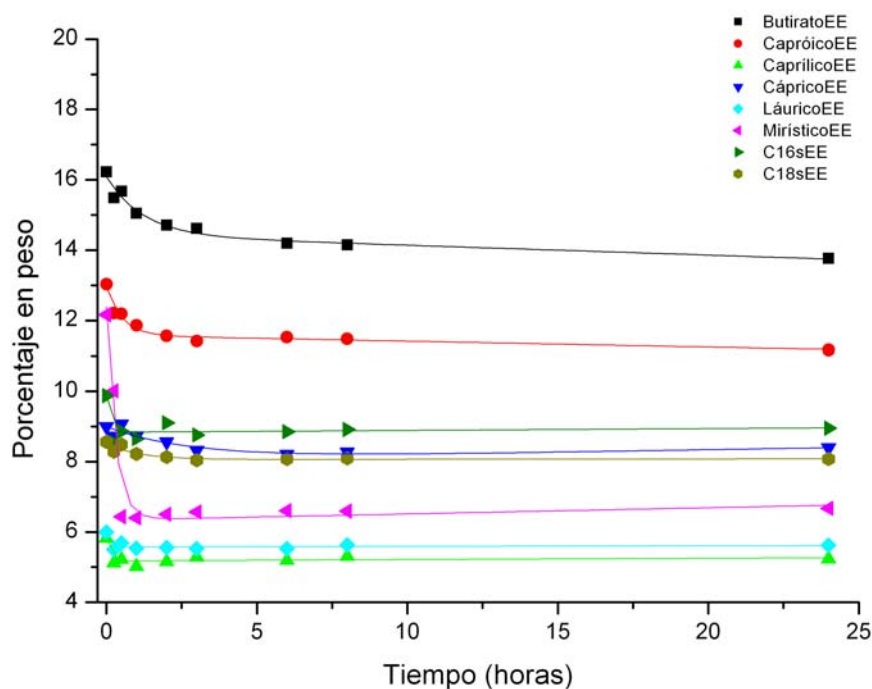


Figura 9. Variación en los porcentajes de los distintos AGEe a lo largo del tiempo en la esterificación de fitoesteros con *Pseudomonas* TL (10% p/p), sin vacío y a 60 °C.

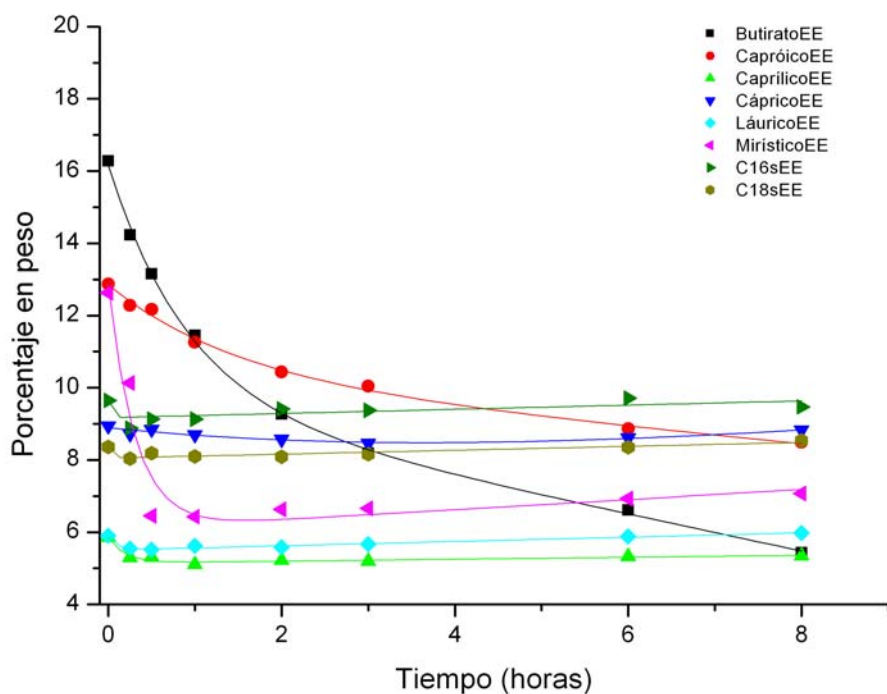


Figura 10. Variación en los porcentajes de los distintos AGEe a lo largo del tiempo en la esterificación de fitoesteros con *Pseudomonas* TL (10% p/p), con vacío (350 mbar) y a 60 °C.

Analizando las figuras, aunque el porcentaje de todos los AGEE desciende a lo largo del tiempo, se constata la mayor especificidad por el ácido mirístico de la lipasa de *Pseudomonas* TL, observándose un consumo pronunciado de este ácido graso en los primeros minutos de la reacción, tanto con vacío como sin vacío. También hay un mayor consumo en la reacción sin vacío de los ácidos grasos más cortos, el butirato de etilo y el caproato de etilo, que son los que están en mayor proporción. En la reacción a vacío se observa claramente como a 350 mbares el porcentaje del butirato de etilo y el caproato de etilo se ve fuertemente afectado por el efecto de destilación, debido a su alta volatilidad.

3.3. Esterificación de fitoesteros con butirato de etilo

Para completar este estudio, se pensó en sintetizar un éster de fitoesterol con ácido butírico, como un medio de sintetizar una molécula que permitiera aumentar el tiempo de vida de este ácido graso dentro de la célula y potenciar su efecto anticancerígeno, ya que el principal problema es que este AG se metaboliza tan rápidamente que solo tiene un efecto de aporte de energía en el organismo (ver Introducción, Capítulo I). Además, podría darse una sinergia del efecto anticancerígeno de fitoesteros y ácido butírico en una sola molécula. Por otro lado, al incorporar un ácido graso de cadena tan corta como el butírico, cabría esperar que el nuevo EF fuera menos apolar, presentando una mayor hidrodispersabilidad.

Como se comentó anteriormente, la lipasa de *C. rugosa* no fue capaz de esterificar el ácido butírico con los fitoesteros, así que se realizó el proceso con la lipasa de *Pseudomonas* TL usando butirato de etilo, según la metodología descrita anteriormente para los AGEE de cadena corta y media. A 60 °C, 350 mbares de vacío y un 10 % (p/p) de carga enzimática se consiguió consumir el total de los fitoesteros añadidos (proporción butirato de etilo: fitoesteros de 5:1) en un tiempo de 3 horas, obteniéndose un 50 % de ésteres de fitoesterol con ácido butírico (ver Figura 11).

Cabe destacar que manteniendo el vacío de 350 mbares hasta un tiempo de reacción de 8 horas, se consiguió destilar el exceso de butirato de etilo y obtener un producto final con un 94 % de ésteres de fitoesterol, por lo que si se aumenta el vacío hasta 2 mbares después de las 3 primeras horas, se puede obtener el producto final casi puro (después de separar el biocatalizador) en apenas 4 horas.

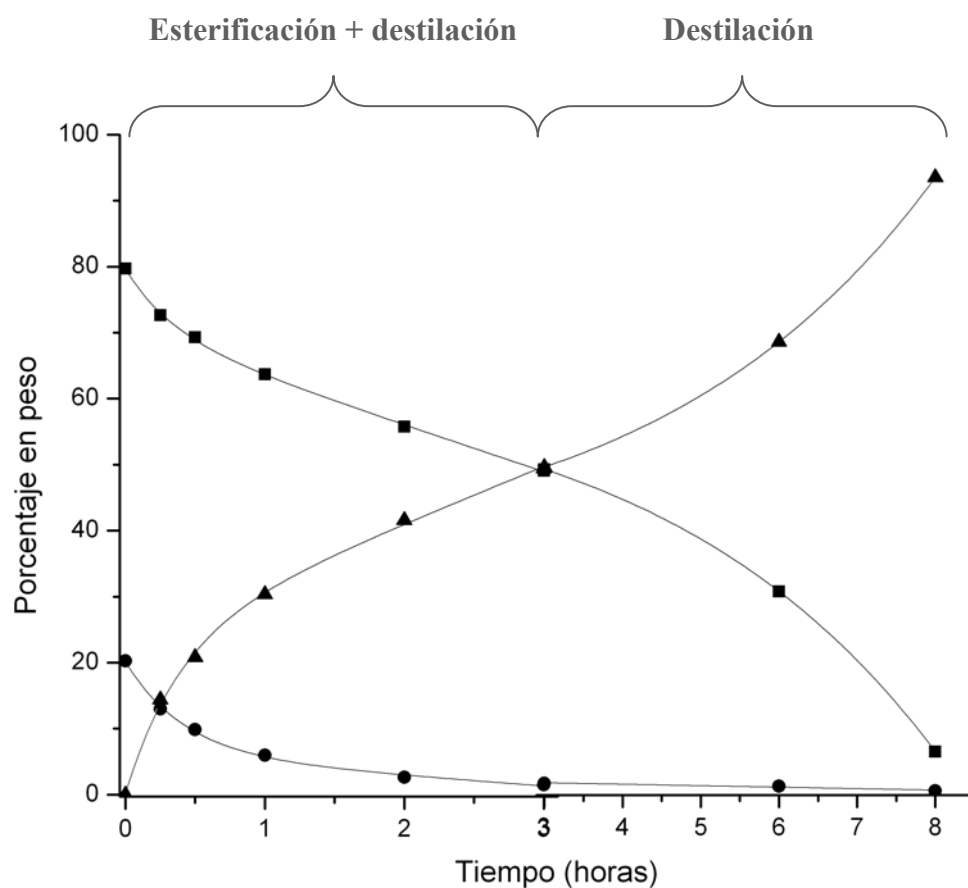


Figura 11. Esterificación de fitoesteros con butirato de etilo con la lipasa de *Pseudomonas* TL con vacío (350 mbares). Símbolos: ■ Butirato de etilo; ● Fitoesteros libres; ▲ Ésteres de fitoesterol. En las 3 primeras horas se produce conjuntamente la reacción de esterificación y la destilación del butirato de etilo. A partir de la tercera hora, cuando se consume todo el fitoesterol, se produce la destilación del exceso de butirato de etilo.

4. CONCLUSIONES

- Se han desarrollado distintas estrategias para sintetizar ésteres de fitoesterol con los distintos tipos de ácidos grasos de la grasa láctea, tanto libres como en sus formas etiladas, con lipasas libres e inmovilizadas.
- Los ácidos grasos libres de la grasa láctea se esterificaron con la lipasa de *C. rugosa*, comercial e inmovilizada, en condiciones equimoleculares, sin emplear disolventes y a 50 °C. Se obtuvieron ésteres de fitoesterol de elevada pureza, tanto con la lipasa comercial, un 94% (peso/peso) en 48 horas, como con la lipasa inmovilizada, un 99% (peso/peso) en tan sólo 9 horas.
- También se desarrolló un proceso para la transesterificación de los fitoesteroles con tributirina, para obtener fitoesteroles esterificados con ácido butírico. Para ello se utilizó la lipasa de *C. rugosa* (10% peso/peso), obteniéndose un 45 % de ésteres de fitoesterol.
- Por último, se ha desarrollado un proceso con la lipasa de *Pseudomonas* TL que permite esterificar los fitoesteroles con concentrados de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media de grasa láctea, así como con butirato de etilo. La metodología usa un vacío moderado (350 mbares) con vista a minimizar la destilación de los ácidos grasos de cadena más corta. Con este proceso se consiguieron un 40 % de ésteres de fitoesterol con los concentrados de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media, y un 50 % de ésteres de fitoesterol con ácido butírico, en sólo 3 horas, en ambos casos. Simplemente aumentando el vacío al final de la reacción se puede conseguir eliminar el exceso de butirato de etilo, llegando a un producto final con un 95 % de pureza. En el caso del exceso de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media, por destilación molecular o fluidos supercríticos también se puede conseguir fácilmente eliminar este exceso.

- Se evaluó la especificidad de sustrato hacia los distintos ácidos grasos de las lipasas comerciales e inmovilizadas de *Candida rugosa* y *Pseudomonas* TL en las reacciones de esterificación, observándose una selectividad moderada hacia el ácido capróico por parte de la lipasa de *C. rugosa* y una gran especificidad por el ácido mirístico por parte de la lipasa de *Pseudomonas* TL.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **Cornell, K.K., Waters, D.J., Coffman, K.T., Robinson, J.P., & Watkins, B.A.**, (1997). *Conjugated linoleic acid inhibited the in vitro proliferation of canine prostate cancer cells*. FASEB J, 11(579).
2. **Chen, Z.-X. & Breitman, T.R.**, (1994). *Tributylin: A Prodrug of Butyric Acid for Potential Clinical Application in Differentiation Therapy*. Cancer Research 54(13): p. 3494-3499.
3. **Parodi, P.W.**, (1997). *Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents*. Journal of Nutrition, 127(6): p. 1055-1060.
4. **Bach, A.C. & Babayan, V.K.**, (1982). *Medium-chain triglycerides: an update*. American Journal of Clinical Nutrition, 36(5): p. 950-962.
5. **Chardigny, J.M., Malpuech-Brugere, C., Dionisi, F., Bauman, D.E., German, B., Mensink, R.P., Combe, N., Chaumont, P., Barbano, D.M., Enjalbert, F., Bezelgues, J.B., Cristiani, I., Moulin, J., Boirie, Y., Golay, P.A., Giuffrida, F., Sebedio, J.L., & Destailats, F.**, (2006). *Rationale and design of the TRANSFACT project phase I: A study to assess the effect of the two different dietary sources of trans fatty acids on cardiovascular risk factors in humans*. Contemporary Clinical Trials, 27(4): p. 364-373.
6. **van de Vijver, L.P.L., M. Kardinaal, A.F., Couet, C., Aro, A., Kafatos, A., Steingrimsdottir, L., Amorim Cruz, J.A., Moreiras, O., Becker, W., van Amelsvoort, J.M.M., Vidal-Jessel, S., Salminen, I., Moschandreas, J., Sigfússon, N., Martins, I., Carbajal, A., Ytterfors, A., & van Poppel, G.**, (2000). *Association between trans fatty acid intake and cardiovascular risk factors in Europe: the TRANSFAIR study*. European Journal of Clinical Nutrition 54(2): p. 126-135.
7. **Blagdon, P.**, (2006). *Phytosterol esters*. Patente: WO2007/019275.
8. **Vazquez, L., Torres, C.F., Fornari, T., Grigelmo, N., Señorans, F.J., & Reglero, G.**, (2006). *Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates*. European Journal of Lipid Science and Technology, 108(8): p. 659-665.
9. **Blanco, R.M., Terreros, P., Muñoz, N., & Serra, E.**, (2007). *Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 47(1-2): p. 13-20.
10. **Sabuquillo, P., Reina, J., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., & Fernandez-Lafuente, R.**, (1998). *'Interfacial affinity chromatography' of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology, 1388: p. 337-348.
11. **Rangheard, M.S., Langrand, G., Triantaphylides, C., & Baratti, J.**, (1989). *Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1004(1): p. 20-28.
12. **Martínez, I., Markovits, A., Chamy, R., & Markovits, A.**, (2004). *Lipase-catalyzed solvent-free transesterification of wood sterols*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 112(1): p. 55-62.

Capítulo VI: Conclusiones finales

1. CONCLUSIONES FINALES

1.- Se ha desarrollado una metodología que permite obtener ésteres de fitoesterol, tocoferoles y ésteres etílicos de ácidos grasos a partir de destilados de desodorización de aceite de soja, con buenos rendimientos, con buena selectividad y con la preservación de la actividad de los biocatalizadores utilizados. El proceso, que se escaló en planta piloto, se centra en dos pasos de modificación enzimática y una etapa de fraccionamiento con CO₂ supercrítico. Los mejores resultados, en términos de rendimiento de los extractos, se obtuvieron a 250 bares, 55 °C y una relación disolvente/alimentación de 35, obteniendo en la fracción no extraída hasta el 82% de los ésteres de fitoesterol con un 72% de rendimiento. Además, el fraccionamiento del extracto permitió la recuperación del 60% de los tocoferoles en el primer separador y el 90% de los ésteres etílicos de los ácidos grasos en el segundo separador.

2.- Se ha conseguido esterificar enzimáticamente fitoesteroles con ácido linoleico conjugado (CLA), usando la lipasa de *Candida rugosa*, y sin añadir disolventes. Los mejores resultados se obtuvieron con un 10% en peso de carga enzimática. En este proceso, la adición de los fitoesteroles en etapas permite reducir el exceso de ácidos grasos utilizados normalmente en los procesos de esterificación de esteroides; y al realizar la segunda etapa de la reacción a vacío (100 milibares), se elimina la acumulación de agua que impide el curso de la reacción. Utilizando esta metodología se obtienen ésteres de fitoesterol con una pureza del 80%.

3.- Se ha desarrollado una nueva metodología combinando etanolisis química y extracción con CO₂ supercrítico, que permite el fraccionamiento de los ácidos grasos de la grasa láctea en forma de ésteres etílicos. Mediante este proceso se obtienen extractos altamente enriquecidos (hasta un 70%) en ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media, y con buenos rendimientos (más del 80%), empleando condiciones de presión y temperatura muy suaves. Además, con el procedimiento desarrollado, se pueden establecer las condiciones de extracción para fraccionar los ésteres etílicos de determinados ácidos grasos en función de su longitud de cadena variando la densidad del CO₂ supercrítico. De este modo se pueden obtener extractos y fracciones no extraídas con diferentes composiciones y valores nutricionales.

4.- Se han desarrollado diferentes estrategias para sintetizar ésteres de fitoesterol con los distintos tipos de ácidos grasos de la grasa láctea, con distintas lipasas libres e inmovilizadas. Los ácidos grasos libres de la grasa láctea se esterificaron con la lipasa de *C. rugosa*, comercial e inmovilizada, en condiciones equimoleculares, sin emplear disolventes y a 50 °C. Se obtuvieron ésteres de fitoesterol de elevada pureza, tanto con la lipasa comercial, un 94% (peso/peso) en 48 horas, como con la lipasa inmovilizada, un 99% (peso/peso) en tan sólo 9 horas.

También se desarrolló un proceso con la misma lipasa para la transesterificación de los fitoesteroles con tributirina, para obtener fitoesteroles esterificados con ácido butírico, obteniéndose un 45 % de ésteres de fitoesterol.

Por último, se desarrolló una metodología para esterificar los fitoesteroles con concentrados de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media de grasa láctea, así como con butirato de etilo. Para ello se usó la lipasa de *Pseudomonas* TL a 60 °C, con un vacío moderado (350 mbares) con vista a minimizar la destilación de los ácidos grasos de cadena más corta. Mediante esta metodología se consiguieron un 40 % de ésteres de fitoesterol con los concentrados de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media, y un 50 % de ésteres de fitoesterol con ácido butírico, en sólo 3 horas en ambos casos. Simplemente aumentando el vacío al final de la reacción se puede conseguir eliminar el exceso de butirato de etilo, llegando a un producto final con un 95 % de pureza. En el caso del exceso de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y media, por destilación molecular o fluidos supercríticos también se puede conseguir fácilmente eliminar el exceso tras la reacción.

5.- En síntesis, en este trabajo se han demostrado las magníficas posibilidades del empleo de la extracción con fluidos supercríticos como técnica para la obtención de extractos con actividad funcional a partir de la grasa láctea y de subproductos de la industria de los aceites vegetales. Al mismo tiempo se han comprobado las grandes posibilidades del uso de enzimas para la obtención de ingredientes lipídicos funcionales, como los ésteres de fitoesterol, sin emplear disolventes y reutilizando los biocatalizadores.

2. FINAL CONCLUSIONS

1.- An enzymatic process for the production of phytosterol esters, tocopherols and fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorized distillates has been developed, with good yields, good selectivity and the preservation of the activity of biocatalysts used. The process was scaled to pilot plant and focuses on two steps of enzymatic modification and one step of supercritical CO₂ fractionation. The best results, in terms of yields of the extracts, were obtained at 250 bar, 55 °C and a ratio solvent-to- feed of 35, getting in the extracted fraction to 82% of phytosterol esters with 72% of yield. In addition, fractionation of the extract allowed the recovery of 60% of tocopherols in the first separator and 90% of ethyl esters of fatty acids in the second separator.

2.- Phytosterols were esterified with conjugated linoleic acid (CLA) by using *Candida rugosa* lipase without solvents. The best results were obtained with a 10 % (w/w) enzyme load. In this process, the addition of phytosterols in stages reduced fatty acids excess, commonly used in sterol esterification processes. Making the second stage of the reaction under vacuum (100 mbar) allowed to eliminate the remaining water that prevented the continuity of the reaction.. By using this methodology we obtained phytosterol esters with a purity of an 80%,

3.- It has been developed a new method by combining chemical ethanolysis and supercritical CO₂ extraction, to fractionate fatty acids ethyl esters of milk fat. Through this process we obtained highly enriched extracts (up to a 70%) of fatty acids ethyl esters of short and medium chain, with good yields (more than an 80%) and using very mild pressure and temperature conditions. Furthermore, with the procedure developed it is possible to set the conditions to fractionate the fatty acids ethyl esters depending on their length of chain into extracts and fractions not extracted, and to obtain products with different nutritional values.

4.- Different strategies have been developed for the synthesis of phytosterol esters with different types of fatty acids from milk fat, using different free and immobilized lipases. Free fatty acids of milk fat were esterified with commercial and immobilized *C. rugosa* lipase, in equimolar conditions, with no solvents and at 50 °C.

By this methodology, 94% and 99% (w/w) of phytosteroyl esters were obtained in 48 h and 9 h with the commercial and the immobilized lipase, respectively.

Also, it's been developed a process to obtain phytosterols with butyric acid by transesterification with tributyrin, using *C. rugosa* lipase. By this process 45% of phytosterol esters were obtained.

Finally, enzymatic esterification of phytosterols with concentrated of short and medium chain fatty acids ethyl esters from milk fat and with ethyl butyrate was performed. We used the *Pseudomonas* TL lipase at 60 °C, with a moderate vacuum (350 mbar) in order to minimize the distillation of shorter chain fatty acids. By this methodology, 40% of phytosterol esters with concentrated of short and medium chain fatty acids ethyl esters and a 50% of phytosterol esters with butyric acid were obtained in only 3 hours in both cases. Simply increasing the vacuum at the end of the reaction, ethyl butyrate excess can be eliminated, reaching a final product with 95% purity. In the case of fatty acid ethyl esters of short and medium chain, by molecular distillation or supercritical fluids the excess can also be easily removed after the reaction.

5.- In summary, this Thesis has demonstrated the great possibilities of the supercritical fluids extraction as a technique to produce fractions with functional activity from industrial by-products from vegetable oils and milk fat; in addition the great possibilities of using enzymes to obtain functional lipid ingredients, such as phytosterol esters, without using solvents and reusing biocatalysts have been shown.

Anexos

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO I

TABLA 1. CONTENIDO TOTAL DE ESTEROLES VEGETALES EN ALIMENTOS REPRESENTATIVOS. FUENTE: ADAPTACIÓN DE [31]	19
TABLA 2. COMPARACIÓN DE LOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL COLESTEROL, FITOESTEROLES Y FITOESTANOLAS	20
TABLA 3. COMPOSICIÓN DE LAS PRINCIPALES LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA HUMANO [48]	25
TABLA 4. DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE DISTINTOS ÁCIDOS GRASOS	45
TABLA 5. CONTENIDO DE CLA (ISÓMERO CIS-9, TRANS-11) EN ALIMENTOS.....	53
TABLA 6. PRINCIPALES ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y MEDIA.....	64
TABLA 7. DENSIDAD, DIFUSIVIDAD Y VISCOSIDAD DE LÍQUIDOS TÍPICOS, GASES Y FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.	79
TABLA 8. PROPIEDADES DEL DIÓXIDO DE CARBONO COMO DISOLVENTE SUPERCRÍTICO	82
TABLA 9. PROPIEDADES CRÍTICAS DE LOS DISOLVENTES MÁS USADOS EN EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA. TEMPERATURA CRÍTICA (T_c), PRESIÓN CRÍTICA (P_c), DENSIDAD CRÍTICA (ρ_c).	83
TABLA 10. COMPARACIÓN ENTRE LA EXTRACCIÓN CON CO ₂ SUPERCRÍTICO Y LA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES	93
TABLA 11. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA BIOCATALISIS.....	101
TABLA 12. PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE (FUENTE: [511]).....	103
TABLA 13. ENZIMAS USADAS EN VARIOS SEGMENTOS INDUSTRIALES Y SUS APLICACIONES.	107
TABLA 14. EJEMPLOS DE LIPASAS MICROBIANAS COMERCIALMENTE DISPONIBLES [524]	113

CAPITULO II

TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL GRADIENTE DE LA FASE MÓVIL (%).	169
TABLA 2.- COMPOSICIÓN DEL DESTILADO DE DESODORIZACIÓN ORIGINAL DE ACEITE DE SOJA (DDS) Y DEL DESTILADO DE DESODORIZACIÓN DE ACEITE DE SOJA MODIFICADO CON ÁCIDO OLEICO (DDSMO).	172
TABLA 3.- COMPOSICIÓN DEL DESTILADO DE DESODORIZACIÓN DE SOJA ORIGINAL (DDS), DEL DESTILADO MODIFICADO CON ÁCIDO OLEICO (DDSMO) Y DEL PRODUCTO FINAL OBTENIDO TRAS LAS MODIFICACIONES ENZIMÁTICAS (DDS-ME).	180
TABLA 4.- COMPOSICIÓN Y RENDIMIENTO EN ÉSTERES DE FITOESTEROL DE LOS FRACCIÓN NO EXTRAÍDAS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE SFE-CC A LAS DIFERENTES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN. HID: HIDROCARBUROS, AGE: ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS, EF: ÉSTERES DE FITOESTEROL, TOC: TOCOFEROLES, AGL: ÁCIDOS GRASOS LIBRES, E: ESTEROLES LIBRES, TAG: TRIACILGLICEROLAS.....	181
TABLA 5.- COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LOS SEPARADORES S1 Y S2 EN LOS ENSAYOS DE SFE-CC. CONDICIONES EN EL S1: 160 BARES Y 55 °C; CONDICIONES EN EL S2: 20 BARES Y 55 °C. DDS-ME: DESTILADO DE DESODORIZACIÓN DE ACEITE DE SOJA MODIFICADO ENZIMÁTICAMENTE; AGE: ÁCIDOS GRASOS ETIL ÉSTERES; EF: ÉSTERES DE FITOESTEROL; TOC: TOCOFEROLES; E: ESTEROLES LIBRES; TAG: TRIACILGLICEROLAS.....	183

CAPITULO III

NO HAY TABLAS

CAPITULO IV

TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL PRODUCTO DE LA ETANOLISIS DE LA GRASA LÁCTEA	210
TABLA 2. RENDIMIENTOS EN PORCENTAJE EN PESO (% P/P) DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN EL FRACCIONAMIENTO CON FLUIDOS SUPERCRTICOS.....	218
TABLA 3. RENDIMIENTOS EN PORCENTAJE EN PESO (% P/P) DE LAS FRACCIONES NO EXTRAÍDAS OBTENIDAS EN EL FRACCIONAMIENTO CON FLUIDOS SUPERCRTICOS.....	219
TABLA 4. COMPOSICIÓN (% P/P) EN AGEE DE LA GRASA LÁCTEA ORIGINAL Y LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN EL FRACCIONAMIENTO CON FLUIDOS SUPERCRTICOS.	220
TABLA 5. COMPOSICIÓN (% P/P) EN AGEE DE LAS FRACCIONES NO EXTRAÍDAS OBTENIDAS EN EL FRACCIONAMIENTO CON FLUIDOS SUPERCRTICOS.....	221

CAPITULO V

TABLA 1. PORCENTAJES DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FITOESTEROLES.....	232
TABLA 2. COMPOSICIÓN DEL CONCENTRADO DE ÉSTERES ETÍLICOS DE AGCC-AGCM DE GRASA LÁCTEA.....	232
TABLA 3. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA LÁCTEA.....	233
TABLA 4. CONSTANTES DE ESPECIFICIDAD PARA LOS DIFERENTES ÁCIDOS GRASOS DE GRASA LÁCTEA EN LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROLES CATALIZADA POR LA LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> . AMBAS REACCIONES SE LLEVARON A CABO A 50 °C CON UN 10% (P/P) DE LA ENZIMA COMERCIAL E INMOVILIZADA.	240

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL COLESTEROL Y DE LOS ESTEROLES VEGETALES MÁS COMUNES.	16
FIGURA 2. MODIFICACIONES DEL GRUPO 3B-HIDROXILO DE LOS ESTEROLES VEGETALES.	17
FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL COLESTEROL	21
FIGURA 4. PROCESO BIOSINTÉTICO DEL COLESTEROL Y SUS PRINCIPALES FUNCIONES.	22
FIGURA 5. ESTRUCTURA GENERAL DE UNA LIPOPROTEÍNA.....	25
FIGURA 6. METABOLISMO DEL COLESTEROL CIRCULANTE.....	26
FIGURA 7. POSIBLES EFECTOS DE LOS ESTEROLES VEGETALES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LIPOPROTEICO [51].....	27
FIGURA 8. CATABOLISMO HEPÁTICO DEL COLESTEROL.....	30
FIGURA 9. ESQUEMA DE ALGUNOS DE LOS SITIOS DE ACCIÓN DE FITOESTEROLES/FITOESTANOL (FES). .	31
FIGURA 10. REDUCCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE COLESTEROL LDL RESPECTO A LA INGESTA DIARIA DE ESTEROLES VEGETALES ESTERIFICADOS [21].	33
FIGURA 11. TOCOFEROLES.....	41
FIGURA 12. TOCOTRIENOLES.	41
FIGURA 13. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA (AGCL) BIOLÓGICAMENTE MÁS IMPORTANTES EN NUTRICIÓN HUMANA	44
FIGURA 14. ÁCIDO OLEICO TRANS (A) (LLAMADO ÁCIDO ELAÍDICO) Y CIS (B).	46
FIGURA 15. ÁCIDO ALFA LINOLÉNICO O ÁCIDO <i>cis</i> -9,12,15-OCTADECATRIENOICO O C18:3 (ω -3).....	46
FIGURA 16. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO C9, T11 (IZQUIERDA) Y ÁCIDO LINOLEICO (DERECHA).....	52
FIGURA 17. PAPEL DE LA BIOHIDROGENACIÓN EN EL RUMEN Y LA Δ 9-DESATURASA TISULAR EN LA PRODUCCIÓN DEL CLA CIS-9, TRANS-11 EN LA GRASA LÁCTEA. ADAPTADO DE BAUMAN Y COL. [351].	61
FIGURA 18. RUTAS BIOQUÍMICAS CLÁSICAS PARA LA BIOHIDROGENACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO Y LINOLÉNICO EN EL RUMEN. ADAPTADO DE [347].	62
FIGURA 19. A, C, E, B48: APOLIPOPROTEÍNAS; AGCL: ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA; AGCM: ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA; AGL: ÁCIDOS GRASOS LIBRES; CETP: TRANSFERIDOR DE LOS ESTERES DE COLESTEROL DE LAS LIPOPROTEÍNAS; HDL: LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD; LPL: LIPOPROTEÍNA LIPASA; LRP: RECEPTOR DE QUILOMICRÓN; QL: QUILOMICRÓN LINFÁTICO; QP: QUILOMICRÓN PLASMÁTICO; QR: QUILOMICRÓN REMANENTE. [366]	65
FIGURA 20. DIAGRAMA DE FASES SÓLIDO/LÍQUIDO/GAS. PTP: PRESIÓN PUNTO TRIPLE, TTP: TEMPERATURA PUNTO TRIPLE, LÍNEA ROJA: CURVA DE SUBLIMACIÓN, LÍNEA VERDE: CURVA DE FUSIÓN, LÍNEA AZUL: CURVA DE VAPORIZACIÓN.	76
FIGURA 21. DIAGRAMA DE FASES DEL CO ₂ (P, T Y P)	78
FIGURA 22. ESQUEMA DE UNA PLANTA DE EXTRACCIÓN DE SÓLIDOS POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (CO ₂)..	87
FIGURA 23. ESQUEMA DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE MUESTRAS SÓLIDAS Y LÍQUIDAS.	90
FIGURA 24. EJEMPLO DE CATÁLISIS ENZIMÁTICA.....	98
FIGURA 25. GRÁFICA DE LAS ENERGÍAS DE LAS DIFERENTES FASES DE UNA REACCIÓN QUÍMICA. LOS SUSTRATOS PRECISAN MUCHA ENERGÍA PARA ALCANZAR EL ESTADO DE TRANSICIÓN, PERO UNA VEZ ALCANZADO, SE TRANSFORMAN EN PRODUCTOS. LA ENZIMA ESTABILIZA EL ESTADO DE TRANSICIÓN, REDUCIENDO LA ENERGÍA NECESARIA PARA FORMAR LOS PRODUCTOS.....	99
FIGURA 26. MERCADO MUNDIAL DE LAS ENZIMAS POR SECTORES DE APLICACIÓN HASTA 2009 (EN MILLONES DE DÓLARES). FUENTE: BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY, INC.	110
FIGURA 27. ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS.	111
FIGURA 28. DIAGRAMA DE LA LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> CON LOS ESTADOS ABIERTO Y CERRADO DE LA TAPADERA SUPERPUESTOS. LA CONFORMACIÓN CERRADA DE LA TAPADERA (OLIGOPÉPTIDO HELICOIDAL) ESTÁ EN AMARILLO Y LA ABIERTA EN ROJO. LOS RESIDUOS QUE FORMAN LA TRIADA CATALÍTICA SE MUESTRAN EN ROJO [519].	112
FIGURA 29. ESPECIFICIDAD POSICIONAL DE LAS LIPASAS EN LA HIDRÓLISIS DE TRIGLICÉRIDOS.	114
FIGURA 30. ESPECIFICIDAD POR ÁCIDO GRASO DE LAS LIPASAS. EN ESTE CASO, EL “ÁCIDO GRASO A” SE HIDROLIZA MEJOR QUE EL “ÁCIDO GRASO B”.....	115

CAPITULO II

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO PROPUESTO PARA LA OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE ESTEROL A PARTIR DE DESODORIZADOS DE ACEITE DE SOJA.	160
FIGURA 2. PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS CON LA QUE SE HA REALIZADO EL PRESENTE TRABAJO (LA FOTOGRAFÍA DE LA DERECHA MUESTRA EL MÓDULO CON LA COLUMNA DE EXTRACCIÓN EN CONTRACORRIENTE ACOPLADO EN EL AÑO 2005).	163
FIGURA 3. DIAGRAMA DE FLUJO EN EL QUE SE REPRESENTA ESQUEMÁTICAMENTE EL FUNCIONAMIENTO DE DICHA PLANTA PILOTO UTILIZANDO LA COLUMNA DE EXTRACCIÓN EN CONTRACORRIENTE PARA MUESTRAS LÍQUIDAS. S1: SEPARADOR 1; S2: SEPARADOR 2; CP: CONTROLADOR DE PRESIÓN. .	164
FIGURA 4. CROMATÓGRAFO DE GASES DE LA MARCA AGILENT (AVONDALE, PA, EEUU).	167
FIGURA 5. EQUIPO DE HPLC EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS DE LÍPIDOS NEUTROS. LA IMAGEN DE LA DERECHA ES EL DETECTOR EVAPORATIVO DE DISPERSIÓN DE LUZ (ELSD).	168
FIGURA 6. SEPARACIÓN DE LAS DIFERENTES CLASES DE LÍPIDOS NEUTROS. 1 ESCUALENO; 2 ÉSTERES DE ESTEROL; 3 CERAS; 4 ÁCIDOS GRASOS ETIL ÉSTERES; 5 ALQUILGLICEROLES DI-ESTERIFICADOS; 6 α -TOCOFEROL; 7 TRIACILGLICEROLES; 8 β -TOCOFEROL; 9 γ -TOCOFEROL; 10 ÁCIDOS GRASOS LIBRES; 11 δ -TOCOFEROL; 12 DIALQUILGLICEROLES NO ESTERIFICADOS; 13 ALQUILGLICEROLES MONO-ESTERIFICADOS; 14 FITOESTEROL; 15 1,3-DIGLICÉRIDOS; 16 1,2-DIGLICÉRIDOS; 17 ALQUILGLICEROLES NO ESTERIFICADOS; 18 MONOGLICÉRIDOS. CANTIDAD DE MUESTRA INYECTADA (10-20 MICROGRAMOS).	169
FIGURA 7.- ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROL DEL DDSMO CATALIZADA POR LIPASA. CONDICIONES: 10 G DE DDSMO, 1 G DE LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> , 35 °C, 200 RPM.	173
FIGURA 8. ESCALADO DE LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CATALIZADA POR LIPASA DEL DDSMO. ENSAYOS 2, 4, 6 Y 8. CONDICIONES: 250 G DE DDSMO, 25 G DE LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> , 35 °C, 200 RPM.	175
FIGURA 9.- ETIL ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS AGL DEL PRODUCTO OBTENIDO DESPUÉS DE LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL DEL DDSMO. CONDICIONES: 10 G DE PRODUCTO, 1 G DE ETANOL, 0,5 G DE NOVOZYM 435, 35 °C, 200 RPM.	177
FIGURA 10.- ESCALADO DE LA ETIL ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS AGL DEL PRODUCTO OBTENIDO DESPUÉS DE LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL DEL DDSMO. ENSAYOS 1, 2 Y 3. CONDICIONES: 250 G DE PRODUCTO, 25 G DE ETANOL, 12,5 G DE NOVOZYM 435, 35 °C.	179
FIGURA 11.- RENDIMIENTO EN ÉSTERES DE FITOESTEROL (□) Y PORCENTAJE EN PESO DE ÉSTERES DE FITOESTEROL (■) Y TOCOFEROL (▲) OBTENIDOS EN FUNCIÓN DE LA PRESIÓN DE LOS ENSAYOS DE SFE, A 55 °C Y UNA RELACIÓN SOLVENT-TO-FEED DE 25.	182
FIGURA 12. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO DESARROLLADO PARA LA OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE FITOESTEROL A PARTIR DE DESODORIZADOS DE ACEITE DE SOJA.	185

CAPITULO III

FIGURA 1. DIAGRAMA DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS EN LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON CLA	192
FIGURA 2. EFECTO DE LA TEMPERATURA (35°C; 40°C) EN LA ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROL DEL DDG CON CLA, CATALIZADA POR LA LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> . CONDICIONES DE REACCIÓN: 1.7 G CLA, 1.25 G FITOESTEROL, 10% P/P DE LIPASA. ▲ ÉSTERES DE FITOESTEROL; ■ CLA; ● FITOESTEROL LIBRES.	194
FIGURA 3. EFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA EN LA ESTERIFICACIÓN DE LOS FITOESTEROL DEL DDG CON CLA, CATALIZADA POR LA LIPASA DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> . (A) 5% DE LIPASA (P/P), (B) 10% DE LIPASA (P/P), (C) 15% DE LIPASA (P/P). CONDICIONES DE REACCIÓN: 1.7 G CLA, 1.25 G FITOESTEROL, 10% P/P DE LIPASA.	195
FIGURA 4. ADICCIÓN EN ETAPAS DE LOS FITOESTEROL EN LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS FITOESTEROL DEL DDG CON CLA. CONDICIONES DE REACCIÓN: 1.7 G CLA, 0.7 G ESTEROL, 10% P/P DE LIPASA. TRAS 24 Y 48 H SE AÑADIERON 0.7 G DE FITOESTEROL.	197
FIGURA 5. EFECTO DE LA ADICCIÓN EN DOS ETAPAS DE LOS FITOESTEROL BAJO VACÍO (100 MILIBARES) EN LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LOS FITOESTEROL DEL DDG CON CLA. CONDICIONES DE REACCIÓN: 1.7 G CLA, 0.7 G DE FT, 10% P/P DE LIPASA. TRAS 24H SE AÑADIERON 1.2 G DE FT. ▲ ÉSTERES DE FITOESTEROL; ■ CLA; ● FITOESTEROL LIBRES.	198

CAPITULO IV

FIGURA 1. ESQUEMA DE TRABAJO EMPLEADO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN	209
FIGURA 2. REACTOR CON TAPA DE 5 VÍAS Y MANTA TÉRMICA (AFORA, ESPAÑA), AGITADOR MECÁNICO (HEIDOLPH INSTRUMENTS, SCHWABACH, ALEMANIA), CONTROLADOR PARA LA TEMPERATURA (SELECTA, ABRERA, ESPAÑA) Y CRIOSTATO (HUBER, OFFENBURG, ALEMANIA) QUE CONDENSA LOS VAPORES GENERADOS DURANTE LA REACCIÓN.	211
FIGURA 3. COMPOSICIÓN EN DETERMINADOS AGEE DE LAS FRACCIONES NO EXTRAÍDAS PARA LAS EXTRACCIONES A 60 °C (DE LA 8 A LA 14).	216

CAPITULO V

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO PROPUESTO PARA LA OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE FITOESTEROL A PARTIR DE LOS DISTINTOS ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA LÁCTEA, BUTIRATO DE ETILO Y TRIBUTIRINA.	231
FIGURA 2. ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL ENZIMA INMOVILIZADO	237
FIGURA 3. COMPARATIVA ENTRE LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON AGL DE GRASA LÁCTEA CATALIZADA POR LA LIPASA DE <i>C. RUGOSA</i> COMERCIAL E INMOVILIZADA. CONDICIONES DE REACCIÓN: 10 % (P/P) DE LIPASA Y 40 °C.....	242
FIGURA 4. LIPASA COMERCIAL. ADICIÓN DE LOS FITOESTEROL EN DOS ETAPAS, LA SEGUNDA A VACÍO (100 MBARES).....	244
FIGURA 5. LIPASA INMOVILIZADA. ADICIÓN DE LOS FITOESTEROL EN DOS ETAPAS, LA SEGUNDA A VACÍO (100 MBARES).....	244
FIGURA 6. TRANSESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON TRIBUTIRINA CATALIZADA POR LA LIPASA DE <i>C. RUGOSA</i> . SÍMBOLOS: ▲ TRIBUTIRINA; ▼ DIBUTIRINA; ◀ MONOBUTIRINA; ○ FITOESTEROL; □ ÉSTERES DE FITOESTEROL CON ÁCIDO BUTÍRICO.	247
FIGURA 7. ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON ÉSTERES ETÍLICOS DE AGCC Y AGCM DE GRASA LÁCTEA CON LA LIPASA DE <i>PSEUDOMONAS</i> TL SIN VACÍO. SÍMBOLOS: ■ AGEE; ● FITOESTEROL LIBRES; ▲ ÉSTERES DE FITOESTEROL	248
FIGURA 8. ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON ÉSTERES ETÍLICOS DE AGCC Y AGCM DE GRASA LÁCTEA CON LA LIPASA DE <i>PSEUDOMONAS</i> TL CON VACÍO (350 MBARES). SÍMBOLOS: ■ AGEE; ● FITOESTEROL LIBRES; ▲ ÉSTERES DE FITOESTEROL	250
FIGURA 9. VARIACIÓN EN LOS PORCENTAJES DE LOS DISTINTOS AGEE A LO LARGO DEL TIEMPO EN LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON <i>PSEUDOMONAS</i> TL (10% P/P), SIN VACÍO Y A 60 °C.	251
FIGURA 10. VARIACIÓN EN LOS PORCENTAJES DE LOS DISTINTOS AGEE A LO LARGO DEL TIEMPO EN LA ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON <i>PSEUDOMONAS</i> TL (10% P/P), CON VACÍO (350 MBAR) Y A 60 °C.....	251
FIGURA 11. ESTERIFICACIÓN DE FITOESTEROL CON BUTIRATO DE ETILO CON LA LIPASA DE <i>PSEUDOMONAS</i> TL CON VACÍO (350 MBAR). SÍMBOLOS: ■ BUTIRATO DE ETILO; ● FITOESTEROL LIBRES; ▲ ÉSTERES DE FITOESTEROL. EN LAS 3 PRIMERAS HORAS SE PRODUCE CONJUNTAMENTE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN Y LA DESTILACIÓN DEL BUTIRATO DE ETILO. A PARTIR DE LA TERCERA HORA, CUANDO SE CONSUME TODO EL FITOESTEROL, SE PRODUCE LA DESTILACIÓN DEL EXCESO DE BUTIRATO DE ETILO.	253

PUBLICACIONES Y PATENTES A LAS QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS

1. **Torres, C.F., Torrelo, G., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2007). *A two steps enzymatic procedure to obtain sterol esters, tocopherols and fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorizer distillate*. *Process Biochemistry*, 42(9): p. 1335-1341.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.005>
2. **Torres, C.F., Torrelo, G., Vazquez, L., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2008). *Stepwise Esterification of Phytosterols with Conjugated Linoleic Acid Catalyzed by Candida rugosa Lipase in Solvent-free Medium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(6): p. 559-562.
<http://dx.doi.org/10.1263/jbb.106.559>
3. **Torres, C.F., Fornari, T., Torrelo, G., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2009). *Production of phytosterol esters from soybean oil deodorizer distillates*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(5): p. 459-463.
<http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200800141>
4. **Torres, C.F., Torrelo, G., Señorans, F.J., & Reglero, G.,** (2009). *Supercritical fluid fractionation of fatty acid ethyl esters from butteroil*. *J. Dairy Sci.*, 92(5): p. 1840-1845.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1492>
5. **Torrelo, G., Torres, C.F., Señorans, F.J., Blanco, R.M., & Reglero, G.,** (2009). *Solvent-free preparation of phytosteryl esters with fatty acids from butterfat in equimolecular conditions in the presence of a lipase from Candida rugosa*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84: p. 745-750.
<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2107>
6. Patente: **Torres, C.F., Señorans, F.J., Reglero, G., Martín, F. M., Soler, C., Torrelo, G. y Vázquez, L.,** (2008) *Procedimiento supercrítico y enzimático para obtener nuevos ésteres de esteroides*. N. de solicitud: P200801435 (España)

